

~~Rec. T/CO-175~~

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 13-9-96
ENTRADA NUM. 1779

ESTUDIO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium leguminosarum*-
Vicia faba L.: METABOLISMO CARBONADO EN
NÓDULOS.



Antonio Ocaña Cabrera

TESIS DOCTORAL

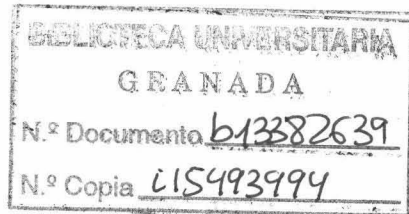
1996

9 SET. 1996
COMISION DE DOCTORADO

t. 4/96

**ESTUDIO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium leguminosarum-*
Vicia faba L.: METABOLISMO CARBONADO EN
NÓDULOS.**

ANTONIO OCAÑA CABRERA



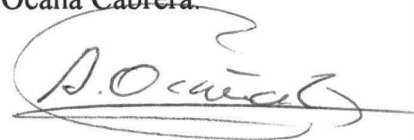
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

1996

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Estudio de la simbiosis *Rhizobium leguminosarum-Vicia faba* L.:
metabolismo carbonado en nódulos.**

Memoria para aspirar al Grado de
Doctor por el Licenciado en Ciencias
Antonio Ocaña Cabrera.



Directores:



Fdo.: Dra. D.ª Carmen Lluch Plá
Catedrático de Fisiología
Vegetal. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.



Fdo.: Dr. D. Francisco Ligeró Ligeró
Profesor Titular de Fisiología
Vegetal. Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

A TRINI Y A MIS HIJOS:

ISABEL Y ANTONIO.

Agradecimientos.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración y apoyo de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, a la Profesora Carmen Lluch Plá, que me brindó la oportunidad de unirme al grupo de Fijación de Nitrógeno y comenzar a dar los primeros pasos en el apasionante mundo de la investigación, al inicio de mi programa de doctorado. El profesor Francisco Liger Liger me orientó y animó en aquellos comienzos. Durante estos años he contado con la amistad de ambos y su valiosa labor de dirección ha hecho posible que este trabajo se culmine.

Durante este tiempo he contado con la ayuda y amistad de muchos compañeros, con los que he compartido muchas y gratas horas de trabajo en el laboratorio: El Doctor Juan Manuel Caba Barrientos me enseñó gran cantidad de técnicas y manejo de aparatos e instrumentos, que sin su ayuda me habría sido muy costoso aprender y con el que considero que tengo una deuda muy especial; la Doctora María del Pilar Cordovilla, que me orientó con las técnicas de electroforesis; las Doctoras Inmaculada Sánchez-Guerrero y M^a Jesús Delgado, que me ayudaron siempre que fue necesario; José Luis Poveda, Sandra Berrido y Juan Manuel Garrido, compañero de cámara de cultivo; Doris Zúñiga, Mariam Soussi, Mariam Khadri y Lina Pliego, actuales compañeras del laboratorio.

Quiero agradecer también la colaboración del grupo de fitohormonas del Departamento, dirigido por el profesor Angel J. Matilla Carro, en cuyo laboratorio realicé parte del trabajo experimental de esta tesis.

También quiero agradecer a los profesores José María Ramos Clavero y Luis F. García del Moral, toda la atención y ayuda que me prestaron con numerosas cuestiones relacionadas con la estadística.

Agradezco especialmente al profesor Luis M^o. Romero Monreal y a los componentes de su grupo, la ayuda que me prestaron con varias técnicas analíticas.

El profesor José Antonio Lupiáñez Cara, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, me prestó una gran ayuda en el estudio y elaboración de los resultados de la purificación de la PEPC, así como en la planificación y puesta a punto de varias técnicas bioquímicas.

La ayuda fundamental para realización de este trabajo ha sido Trini, mi mujer, que siempre me ha apoyado y animado, sabiendo comprender y soportar las muchas horas, días, fines de semana, que este trabajo le ha robado. Ella y mis hijos, Isabel y Antonio, dan sentido a este esfuerzo. Junto a ellos, mis padres han sido otro estímulo transcendental en el trabajo.

A todos vosotros, muchísimas gracias.

Abreviaturas.

AOA:	Ácido oxalacético
ARA:	Actividad reductora de acetileno específica
ARAP:	Actividad reductora de acetileno total por planta
DEAE:	Dietilaminoetil
DTT:	Ditiothreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
G6PDH:	Glucosa-6-P deshidrogenasa
6PGDH:	6-fosfogluconato deshidrogenasa
IA:	Invertasa alcalina
ICDH:	Isocitrato deshidrogenasa
α KG:	Ácido 2-oxoglutárico
MDH:	Malato deshidrogenasa
PA:	Parte aérea
PEP:	Fosfoenolpiruvato
PEPC:	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PRT:	Contenido de proteína
SS:	Sacarosa sintasa
Tris:	Trihidroximetilaminometano
TTO:	Tratamiento
U:	Unidades
v/v:	Volumen/volumen
ϵ :	Coefficiente de extinción molar



Índice

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1. Fijación biológica del nitrógeno.	3
2. Las leguminosas.	5
2.1. El orden Leguminales.	5
2.1.1. <i>Vicia faba</i>	7
2.1.2. <i>Phaseolus vulgaris</i>	8
2.2. Variabilidad genotípica.	9
3. El microsimbionte: <i>Rhizobium</i>.	10
3.1. Familia <i>Rhizobiaceae</i>	11
4. Proceso de nodulación.	15
4.1. El nódulo.	15
4.2. El simbiosoma.	19
4.2.1. Espacio peribacteroidal.	20
4.2.2. Membrana peribacteroidal (MPB).	20
4.2.3. Permeabilidad de la MPB.	22
5. Metabolismo del nódulo.	23
5.1. Nitrogenasa.	23
5.2. Metabolismo del hidrógeno.	24
5.3. Energía de la fijación de nitrógeno.	26
5.4. Metabolismo del carbono.	29
5.4.1. Contenido de metabolitos.	29
5.4.2. Procesos oxidativos del nódulo.	31
5.4.2.1. Metabolismo enzimático de la sacarosa.	31
5.4.2.2. Metabolismo de la glucosa.	35
5.4.2.3. Vía de las pentosas fosfato (PPP).	36
5.4.2.4. Producción de ácidos dicarboxílicos.	37
A) Fosfoenolpiruvato carboxilasa	38
B) Malato deshidrogenasa	41
C) Isocitrato deshidrogenasa	42
5.4.2.5. Vías fermentativas: Anaerobiosis.	44
6. Interacción del nitrógeno combinado con el proceso de fijación de nitrógeno.	45
6.1. Efecto del nitrato: concentración.	45
6.2. Procesos que se afectan con el nitrato.	46

6.3. Mecanismos de inhibición del nitrato.	47
7. Nutrición inorgánica en la simbiosis.	49
II. OBJETO.	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	59
1. Material biológico.	61
1.1. Material vegetal.	61
1.2. Microorganismos.	62
2. Medios de cultivo	62
2.1. Solución nutritiva para plantas	62
2.2. Medio de cultivo para <i>Rhizobium</i>	62
3. Cultivo de plantas.	63
3.1. Esterilización y germinación de las semillas.	64
3.2. Preparación del inóculo	64
3.3. Siembra e inoculación	64
3.4. Condiciones de la cámara de cultivo	65
4. Experimentos realizados.	65
4.1. Caracterización general del metabolismo carbonado y eficiencia de la fijación del nitrógeno en nódulos de <i>Vicia faba</i> a lo largo de la ontogenia del cultivo.	66
4.2. Efecto de la cepa de <i>Rhizobium</i> utilizada para la inoculación.	66
4.3. Efecto del genotipo de la planta sobre el crecimiento, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.	67
4.4. Influencia del nitrato y su interacción con la fijación de nitrógeno.	67
5. Metodología empleada.	68
5.1. Análisis del crecimiento.	68
5.2. Actividades de la nitrogenasa.	69
5.2.1. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa	69
5.2.2. Actividad reductora de acetileno.	69
5.2.3. Cálculo de la eficiencia relativa.	70
5.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos.	70
5.3.1. Preparación de extractos libres de células del citosol nodular.	70
5.3.2. Valoración de las actividades enzimáticas.	71

5.3.3. Actividad sacarosa sintasa.	72
5.3.4. Actividad invertasa alcalina.	72
5.3.5. Actividad glucosa-6-P deshidrogenasa.	73
5.3.6. Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa.	74
5.3.7. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa.	75
5.3.8. Actividad malato deshidrogenasa.	76
5.3.9. Actividad isocitrato deshidrogenasa.	76
5.4. Determinaciones analíticas realizadas en nódulos.	77
5.4.1. Determinación de proteína soluble.	77
5.5. Determinaciones realizadas en parte aérea y raíz.	77
5.5.1. Determinación de nitrógeno.	78
5.5.2. Determinación de potasio y sodio.	78
5.5.3. Determinación de calcio y magnesio.	78
6. Presentación y estudio estadístico de los resultados.	79
7. Estudio sobre la fosfoenolpiruvato carboxilasa de nódulos de <i>Vicia faba</i>: purificación parcial y caracterización.	79
7.1. Purificación parcial.	79
7.1.1. Extracción.	80
7.1.2. Medida de la actividad.	80
7.1.3. Precipitación con sulfato amónico.	80
7.1.4. Cromatografía de intercambio iónico.	80
7.1.5. Ultrafiltración.	81
7.1.6. Cromatografía de exclusión molecular.	81
7.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.	83
7.3. Caracterización de la actividad PEPC.	84
7.3.1. Determinación de la Km y efecto del pH.	84
7.3.2. Efecto del malato.	84
7.3.3. Efecto de la glucosa-6-P.	85
7.3.4. Estudio del efecto combinado del malato y la glucosa-6-P. ...	85
IV. RESULTADOS.	87
1. Caracterización del metabolismo carbonado y eficiencia de la fijación de nitrógeno en nódulos de <i>Vicia faba</i> a lo largo de la ontogenia del cultivo.	89
1.1. Análisis del crecimiento.	90
1.2. Fijación de nitrógeno.	93
1.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.	98
2. Estudio del efecto de la cepa de <i>Rhizobium</i> utilizada como micro simbionte en la utilización del carbono por el nódulo.	107

2.1. Análisis del crecimiento.	108
2.2. Fijación de nitrógeno.	111
2.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en los nódulos. .	115
2.4. Determinaciones analíticas.	121
3. Efecto del genotipo de la planta sobre el crecimiento, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.	127
3.1. Análisis del crecimiento.	127
3.2. Fijación de nitrógeno.	131
3.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en los nódulos. .	135
3.4. Determinaciones analíticas.	141
4. Influencia del nitrato y su interacción con la fijación de nitrógeno.	147
4.1. Resultados obtenidos con habas.	148
4.1.1. Análisis del crecimiento.	148
4.1.2. Fijación de nitrógeno.	150
4.1.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.	155
4.1.4. Determinaciones analíticas.	161
4.2. Resultados obtenidos con judía.	169
4.2.1. Análisis de crecimiento.	169
4.2.2. Fijación de nitrógeno.	172
4.2.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.	177
4.2.4. Determinaciones analíticas.	184
5. Purificación parcial y caracterización de la fosfoenolpiruvato carboxilasa nodular de <i>Vicia faba</i>.	191
5.1. Purificación parcial de la fosfoenolpiruvato carboxilasa	191
5.2. Propiedades de la PEPC de nódulos radicales de habas.	194
5.2.1. Determinación del peso molecular.	194
5.2.2. Efecto del pH.	196
5.2.3. Cinética de saturación con el sustrato (PEP).	198
5.2.4. Activación por la glucosa-6-fosfato.	199
5.2.5. Inhibición por el malato.	199
5.2.6. Efecto conjunto de la glucosa-6-P y el malato.	201
V. DISCUSIÓN.	203
VI. CONCLUSIONES.	213
VII. BIBLIOGRAFÍA	217

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. Fijación biológica del nitrógeno.

El proceso de fijación biológica del nitrógeno implica la reducción enzimática del nitrógeno atmosférico a amonio, que podrá ser posteriormente asimilado y utilizado en el crecimiento celular. La fijación de nitrógeno es exclusiva de bacterias, por tanto las plantas que fijan nitrógeno deben estar asociadas en simbiosis con bacterias. Resulta evidente que el conocimiento de la fijación biológica del nitrógeno es esencial para dilucidar la dinámica del ciclo del nitrógeno (Evans y Burris, 1990).

La mayoría de los elementos biológicos, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre están sujetos a procesos cíclicos siendo el más importante de todos ellos desde el punto de vista ecológico y económico el ciclo del nitrógeno (Fig. 1). Esencialmente este ciclo simboliza las transformaciones que experimenta el nitrógeno del planeta a través de los organismos vivos. Forma parte del ciclo del nitrógeno la síntesis de moléculas nitrogenadas durante el crecimiento de las plantas, su consumo por los animales y su vuelta al suelo como resultado de la degradación de la materia orgánica animal y vegetal. También se incluyen las pérdidas de nitrógeno a la atmósfera procedente del nitrato y su vuelta por medio del proceso de fijación biológica. Además la fijación de nitrógeno puede ser también abiótica como resultado de las reacciones químicas atmosféricas. La complejidad e interés de este ciclo ha sido revisada por Sprent (1987), Postgate (1990) y Martínez-Toledo (1992), entre otros autores.

El nitrógeno se considera el nutriente más limitante, con la excepción del agua, para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural. Sin embargo, cuantitativamente es uno de los elementos más abundantes de la biosfera, constituyendo el 79% del peso de la atmósfera. Obviamente por su carácter inerte, no resulta útil como fuente de nitrógeno para los seres vivos y por ello la absorción de nitrógeno a través de la fijación biológica tiene un efecto ecológico importante.

La integración del nitrógeno fijado en sistemas agrícolas está mediada por la simbiosis entre leguminosas y especies del género (*Brady*)*Rhizobium*, no leguminosas y *Frankia* spp., cianobacterias y numerosos sistemas no simbióticos en los cuales los diazotrofos fijadores de nitrógeno en vida libre se asocian a raíces de plantas no leguminosas. Se asume que estos sistemas fijadores de nitrógeno pueden satisfacer

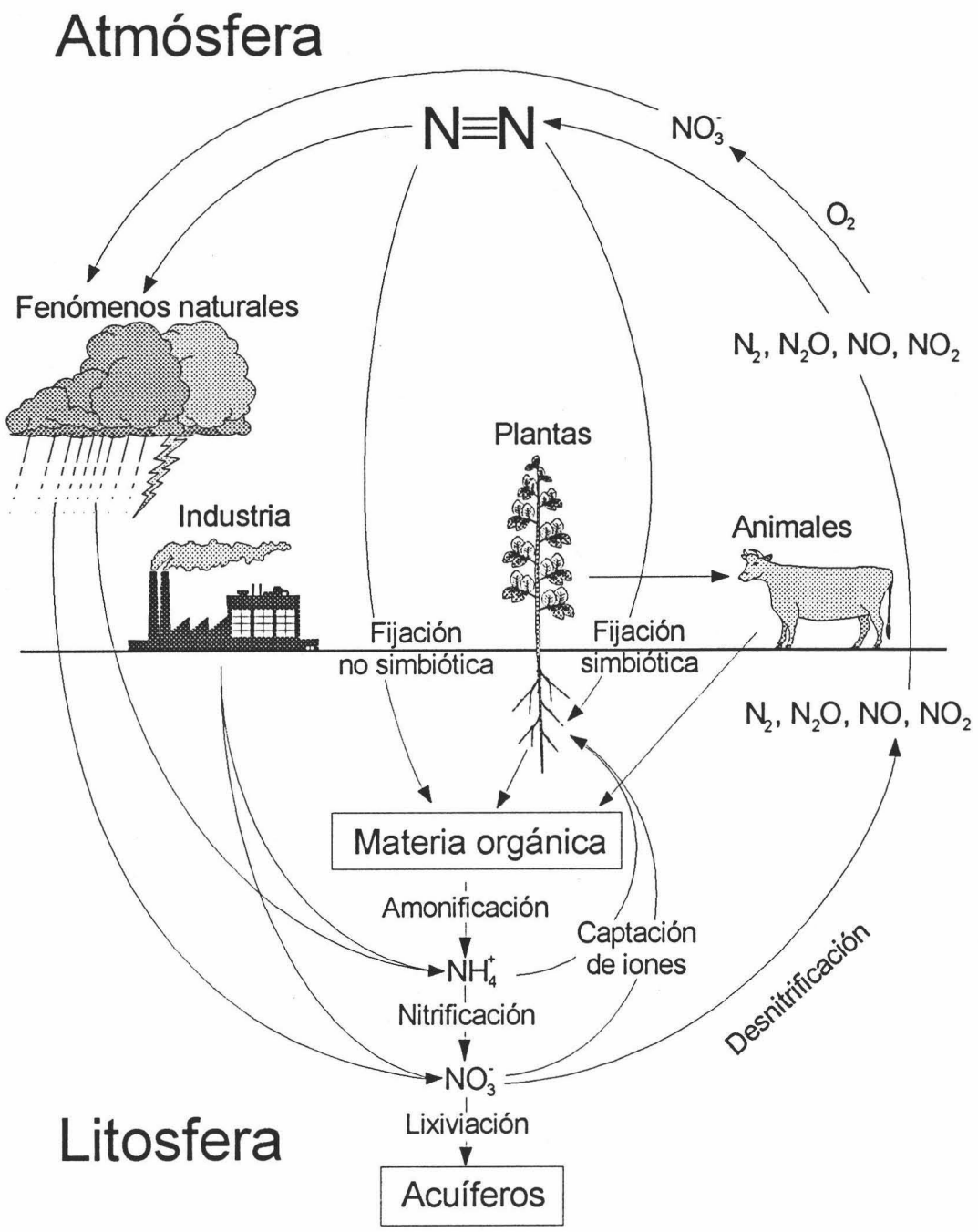


Fig. 1.1. El ciclo del nitrógeno en la naturaleza

unagran cantidad de sus requerimientos de nitrógeno del atmosférico. Además el nitrógeno fijado puede contribuir a las reservas del suelo en beneficio de otros cultivos o especies forrajeras. El flujo de nitrógeno terrestre procedente de la fijación de nitrógeno se establece en el rango de $140-170 \cdot 10^6$ Tm/año (Burns y Hardy, 1975; Paul, 1988). Sin embargo, en términos absolutos la fijación de nitrógeno es pequeña comparándola con las reservas de nitrógeno del suelo ($105 \cdot 10^9$ Tm), pero es varias veces mayor que el nitrógeno procedente de los fertilizantes, $65 \cdot 10^6$ Tm/año (Paul 1988). La contribución relativa de la fijación de nitrógeno en vida libre o en asociación simbiótica es del orden del 70% simbiótica y del 30% no simbiótica, y en zonas agrícolas puede cambiar dominando más la fracción simbiótica (Burns y Hardy, 1975).

2. Las leguminosas.

Las especies de leguminosas cultivadas tienen gran importancia en alimentación humana y animal. Las denominadas leguminosas-grano proporcionan semillas que se consumen maduras y secas, verdes e inmaduras e incluso las semillas inmaduras en el interior de las vainas verdes. Las especies utilizadas como forrajeras proporcionan hojas y tallos para el ganado. Otras se utilizan para la producción de aceites comestibles (cacahuete y soja).

Las leguminosas grano tienen gran importancia en la alimentación por su elevado contenido proteico, constituyendo en muchos países la segunda fuente de proteínas después de los cereales (Waggoner, 1994). Además, son un complemento natural de éstos ya que contienen cantidades adecuadas de lisina, pero son deficientes en metionina y cistina mientras que los cereales son deficientes en lisina pero contienen metionina y cistina (Mahe *et al.*, 1994).

Además de su gran valor como producto alimenticio las leguminosas cultivadas son importantes por su capacidad para fijar nitrógeno y elevar la fertilidad del terreno, reemplazando parcialmente el uso de fertilizantes nitrogenados caros y contaminantes. No hay duda de las grandes perspectivas en el mundo agrícola de la fijación de nitrógeno (Vance y Graham, 1995).

2.1. El orden Leguminales.

Está formado por 16.000 a 19.000 especies clasificadas en unos 750 géneros con distribución mundial. Esta enorme familia solo es superada en tamaño por las

orquídeas y las compuestas; en importancia económica solo es superada por las gramíneas.

Se divide en tres familias: *Mimosaceae*, *Cesalpiniaceae* y *Fabaceae*. Esta división se basa principalmente en diferencias florales. Algunos autores han dado a los tres grupos la categoría de subfamilia *Mimosoideae*, *Cesalpinoideae* y *Papilionoideae* dentro de la familia *Leguminosaceae*. De cualquier manera la distinción entre los tres grupos básicos es clara y universalmente aceptada.

La familia *Mimosaceae* está formada por especies arbóreas y algunas hierbas perennes. Incluye muchas especies ornamentales y de interés en la producción de materias primas, taninos, mucílagos, perfumes y colorantes. Presenta hojas pinnadas o bipinnadas y flores regulares (actinomorfas). El cáliz presenta cinco lóbulos y la corola cinco pétalos iguales. Los estambres son diez o múltiplo de diez, libres unidos por la base o unidos formando un tubo. El fruto es una vaina recta, curvada o en forma de espiral con dos valvas, dehiscente. Algunas especies son fuente de nitrógeno en ecosistemas extremos, como regiones árticas o bosques australianos. El 30% de los géneros estudiados presentan nódulos radicales (Allen y Allen, 1981), excepto *Neptunia* que forma nódulos en los tallos. La estructura del nódulo presenta aspectos característicos como la ausencia del cordón de infección. Los nódulos se encuentran en raíces carentes de pelos radicales y no asociados a raíces laterales, por lo que en estas plantas la infección tiene lugar entre células epidérmicas de la raíz o bien a través de heridas (Sprent *et al.*, 1987).

La familia *Cesalpiniaceae* es la más antigua desde el punto de vista evolutivo. Comprende árboles, arbustos y raramente hierbas. Algunas especies son de interés en la producción de madera o de materias primas de interés farmacéutico. Tienen hojas pinnadas o bipinnadas. Las flores son irregulares (zigomorfas) usualmente en racimos. El cáliz tiene cinco lóbulos solapados o separados. Normalmente tiene cinco pétalos, a veces rudimentarios o ausentes, ligeramente desiguales. Los estambres, libres o unidos, son diez o menos. El fruto es una vaina a veces indehiscente, algunas con suturas aladas (sámara). Sólo un 3-5% por ciento de las especies forman nódulos (Sprent, 1987).

La familia *Fabaceae* está formada por árboles, arbustos, hierbas anuales y perennes. Incluye todos los cultivos de importancia agrícola por sus semillas utilizadas en alimentación o producción de aceites, así como la mayor parte de las especies forrajeras de interés. También se encuentran en esta subfamilia especies utilizadas en

horticultura ornamental y en plantaciones que previenen la erosión del suelo y aumentan el contenido en nitrógeno del mismo. Las leguminosas grano de mayor interés pertenecen en su mayoría a las tribus *Phaseoleae*, *Vicieae* y *Cicereae*. Las leguminosas usadas como pastos y forrajes se agrupan en las tribus *Trifolieae* y *Loteae*. La tribu *Aeschynomeneae* contiene una importante leguminosa grano, el cacahuete. A la tribu *Genisteeae* pertenece el género *Lupinus*. Presentan hojas palmadas con tres o más foliolos, o pinnadas. Las flores son muy irregulares (corola papilionácea) en inflorescencias terminales o axilares. El cáliz es tubular con cinco lóbulos regulares. La corola presenta cinco pétalos desiguales: el estandarte superior y exterior, dos pétalos laterales que se denominan alas y dos pétalos inferiores e interiores, frecuentemente unidos por el borde inferior, que constituyen la quilla. Los estambres suelen estar unidos en dos haces (9+1 o 5+5) o en un haz tubular, raramente libres. El fruto es una vaina de forma variada, normalmente con dos valvas y dehiscente. El 97% de las especies de esta subfamilia forman nódulos (Allen y Allen, 1981).

2.1.1. *Vicia faba*.

Forma parte de un amplio género, incluido en la tribu *Vicieae*, con unas 150 especies. Es una especie ampliamente distribuida en las zonas templadas del hemisferio norte (Europa) y en América del Sur (Blamey y Gery-Wilson, 1991) habiendo sido citada por primera vez por Linneo en 1735. Es una leguminosa anual de tallo único, erecto, duro, hueco y frondoso. Su altura varía de 60 a 180 cm. No tiene zarcillos. Presenta una raíz principal bien desarrollada con muchas raíces laterales que sostienen racimos de nódulos pequeños y lobulados que crecen horizontalmente. Las hojas son alternas, pinnadas, enteras, ovaladas y con una longitud entre 5 y 7,5 cm. El peciolo es acanalado, con pequeños pulvínulos. Las flores nacen en la axila de la hoja y son de color variable.

La sistemática de las especies de haba es muy confusa. Así, clásicamente se han reconocido dos variedades distintas: *hortensis* o haba de jardín o culinaria y *equina* o haba de campo. Murotava (1931) subdivide a *Vicia faba* en dos especies, *paucijuga* y *faba*, según el número de foliolos por hoja, y esta última en tres variedades, *major*, *equina* y *minor*, según la relación grosor/longitud foliar. Cubero y Suso (1981) encuentran que la principal característica que discrimina a estos grupos de cultivares es el tamaño de la semilla mientras que Suso *et al.* (1986) lo relacionan con cuatro características de las hojas: foliolos por hoja, longitud del raquis, densidad de foliolos y forma de los foliolos. Cubero (1984) sugiere que existen cuatro

subespecies: *minor* (semillas pequeñas, redondeadas, tipificada como el haba común), *equina* (tamaño medio, tipificada como el haba de burro), *faba* (variedad mayor, haba culinaria o de horticultura con semilla ancha y grande) y *paucijuga*, que ya había reconocido Hanelt (1972) como una raza geográfica de la subespecie *minor*.

Las semillas muestran una gran variación: algunas son angulosas y están fuertemente comprimidas; otras son casi globosas. Su coloración externa puede ser blanca, amarilla, marrón, verde, púrpura o negra; todas poseen hilo prominente que puede ser blanco, amarillo o negro (Kay, 1979).

La composición aproximada de las semillas es de 11% de humedad, 30% de proteínas, 45% de carbohidratos, 2% de grasa, 8% de fibra y 4% de cenizas (Gueguen y Cerletti, 1994). Se han identificado como proteínas mayoritarias las proteínas de 7S y 11-13S, correspondientes a vicilina y legumina de las globulinas, y las albúminas (Melo *et al.*, 1994). La relación entre las distintas proteínas varía con la variedad y el genotipo (Pasqualini *et al.*, 1991). La composición de aminoácidos demuestra que son más ricas en lisina que los cereales (Mahe *et al.*, 1994) y más pobres en aminoácidos azufrados. Los flavonoides de diversos genotipos de *Vicia faba* han sido estudiados por Torck y Pinkas (1992), los taninos de la testa por Crofts *et al.* (1980), y los factores antinutritivos por Fernández-Quintela *et al.* (1993).

2.1.2. *Phaseolus vulgaris*.

El género *Phaseolus* es un grupo natural, bien definido, con una base geográfica americana muy clara, probablemente de origen evolutivo relativamente reciente comparado con otros géneros relacionados como *Vigna*.

La judía, *Phaseolus vulgaris*, es la especie mejor conocida y más ampliamente distribuida de este género. Su origen se establece en el oeste de México y Guatemala, aun cuando existen pruebas que sugieren su aclimatación en Centroamérica a partir de especies ancestrales extendidas y polimórficas. Actualmente se localiza en distintas partes de los trópicos, subtropicos y regiones templadas, siendo la legumbre alimenticia más importante en Latinoamérica y parte de África (Hidalgo, 1991; Schoonhoven y Voysest, 1991).

Es una herbácea anual con gran variabilidad en los caracteres vegetativos, color y tamaño de las flores, forma y color de las vainas y semillas, etc. En general, todas tienen una raíz central bien desarrollada que crece rápidamente con raíces

laterales limitadas principalmente a la zona superior del suelo y que portan nódulos esféricos. Los tallos son delgados, retorcidos, angulosos y nerviados; también pueden ser trepadores que alcanzan dos o tres metros de altura y enanos de veinte a sesenta centímetros. Las hojas son alternas, trifoliadas, a menudo algo peludas, con un peciolo largo, estriado por la zona superior y con un notable pulvínulo en la base. Las foliolas son ovaladas, enteras, acuminadas de cinco a ocho centímetros de ancho por diez a quince de largo. Las flores nacen sobre racimos axilares de pocas flores; los pedicelos son cortos; la corola puede ser blanca, amarillenta, rosa o violeta. La judía normalmente se autofecunda, teniendo lugar la polinización en el momento de la apertura de la flor. Las vainas generalmente son finas, rectas o ligeramente curvadas. El color puede variar desde el amarillo hasta el verde oscuro, teniendo a veces manchas rosa o púrpura. El número de semillas puede oscilar entre una y doce; muestran variación importante en su color, tamaño y medida (Allen y Allen, 1991).

2.2. Variabilidad genotípica.

Los caracteres identificativos de los cultivares o variedades comerciales, de acuerdo con el Reglamento de Producción de Semillas, pueden ser morfológicos, fisiológicos, químicos y citológicos. Evidentemente la mejora de los sistemas de identificación pasa por el aumento de los conocimientos sobre la genética de caracteres adecuados. Así, en habas existen trabajos sobre la herencia del color de la flor, carácter que parece exhibir una gran variabilidad, mostrando en algunos casos una regulación compleja (Moreno *et al.*, 1984). De los caracteres métricos empleados, basados en las medidas de caracteres con el uso de testigos, será importante conocer su estabilidad, homogeneidad y el grado de manifestación dentro de unas condiciones (Martín y Gutiérrez, 1983).

El desarrollo de la técnica de electroforesis en la década de los años cincuenta y su aplicación al estudio de los caracteres identificativos de las distintas poblaciones, permitió conocer la variabilidad que presentan. Mediante esta técnica se puede estudiar una muestra aleatoria del genoma y no solamente los genes que provocan un drástico efecto genotípico o genes deletéreos (Lewontin, 1974). Los caracteres estudiados por electroforesis muestran además relaciones sencillas entre genotipo y fenotipo, lo que permite detectar claramente las diferencias genotípicas causadas por la sustitución de alelos de un locus sencillo, así como distinguir las sustituciones alélicas que ocurren en los distintos loci.

Al analizar los niveles de variabilidad en plantas hay que tener en cuenta el sistema reproductivo ya que, incluso en la misma especie, la autogamia origina menos variabilidad genética que la alogamia (Shannon, 1982), la domesticación, puesto que la variabilidad de los cultivares es menor que la de las poblaciones silvestres (Loukas *et al.*, 1983) y la poliploidía, que ha sido poco estudiada.

En habas, Gates y Boulter (1979a) han encontrado que los patrones electroforéticos de esterases no específicas en semilla y polen, permiten identificar un gran número de líneas puras y sus híbridos. Estos patrones son bastante independientes de las condiciones de crecimiento y del régimen de nitrógeno como fertilizante (Gates y Boulter, 1979b).

Muchas enzimas en plantas tienen isoenzimas, puesto que la misma reacción está presente en compartimentos celulares distintos. El número y la localización subcelular parece estar altamente conservada en la evolución del cultivo. Es por ello que el estudio de isoenzimas puede probablemente contribuir a cuantificar la cantidad y distribución de la variación genética de un cultivar (Doebley, 1990).

En un amplio estudio realizado con 29 genotipos de *Vicia faba*, Caba *et al.* (1993) describen una alta variabilidad en la respuesta de estos genotipos al nitrato del medio en relación a las enzimas de la asimilación del amonio. También se ha descrito esta variabilidad genotípica en la distribución de la actividad nitrato reductasa en la planta (Caba *et al.*, 1994a; 1995) y en el crecimiento, nodulación y acumulación de nitrógeno reducido (Caba *et al.*, 1994b).

La biotecnología puede ser aplicada a distintos programas de mejora en la producción de *Vicia faba* incluyendo la variación en el contenido de aminoácidos de las proteína de reserva, la resistencia a nuevas formas de hongos, insectos y virus (Ramsay y Cubero, 1995). La adaptación y/o tolerancia a la salinidad se puede considerar otro factor importante a tener en cuenta en estos programas (Cordovilla *et al.*, 1995), sin embargo, un conocimiento profundo del metabolismo y fisiología de los genotipos se hace necesario.

3. El microsimbionte: *Rhizobium*.

La fijación de nitrógeno no ha sido encontrada en eucarióticas, pero está ampliamente distribuida entre eubacterias y archeobacterias. La clásica catalogación de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Postgate, 1987; Gallon y Chaplin, 1987) no

refleja la verdadera evolución genética de las bacterias, sin embargo de los últimos años se dispone de datos moleculares y genéticos que han contribuido a reestructurar esta clasificación. Young (1992) ha elaborado un catálogo de fijadores de nitrógeno en el que se engloban cerca de un centenar de géneros en ocho categorías. Esta recopilación es consecuencia de estudios a nivel molecular por hibridación, catalogación de oligonucleótidos y secuenciación, siendo la clave del proceso la biomolécula 16s de ARN ribosómico que es universal y conserva su función (Woese, 1987).

3.1. Familia *Rhizobiaceae*.

El manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Krieg y Holt, 1986) establece que la familia *Rhizobiaceae* tiene cinco géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Agrobacterium*.

El género *Rhizobium* incluye seis especies (Elkam, 1992):

a) *Rhizobium leguminosarum* cuyas funciones simbióticas están codificadas en un plásmido y la misma cepa puede nodular tres leguminosas dependiendo de la especificidad del plásmido. La especificidad por el huésped determina la biovariedad. Hay tres grupos de huéspedes: a) *Trifolium* para la biovariedad *trifolii* b) *Phaseolus* para la biovariedad *phaseoli* c) *Pisum*, *Lathyrus*, *Vicia* y *Lens* para la biovariedad *viciae*.

b) *Rhizobium meliloti* nodula a especies del género *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*.

c) *Rhizobium loti* agrupa a microorganismos capaces de nodular un amplio rango de hospedadores entre los que se encuentran *Lotus*, *Cicer*, *Robinia pseudoacacia*, *Mimosa*, *Lupinus*, *Onobrychis* y *Leucaena*. Nour *et al.* (1994) proponen que el *Rhizobium* que infecta a *Cicer arietinum* debe ser designado como la nueva especie *Rhizobium ciceri*.

d) *Rhizobium galegae* (Lindström, 1989) que infecta a especies del género *Galega*.

e) *Rhizobium kuakuii* (Chen *et al.*, 1991) que infecta a especies del género *Astragalus* una leguminosa forrajera de invierno que presenta una homología distinta de las descritas para otras especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Las dos últimas especies del género *Rhizobium* están relacionadas con el *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. Cuando esta bacteria se aísla de nódulos procedentes de especies de *Phaseolus* de zonas de América Central o Sudamérica, presenta dos grupos distintos, cepas de tipo I considerada actualmente nueva especie *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1989) y cepas de tipo II denominada *Rhizobium tropici* (Martínez *et al.*, 1991) que infecta a *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena* spp. y *Macroptilium* spp. *Rhizobium etli* presenta una alta homología con el DNA de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii* (Martínez-Romero, 1994).

Género *Bradyrhizobium*. Se consideran especies de crecimiento lento y clásicamente se reconoce una única especie *Bradyrhizobium japonicum* que nodula a *Glycine*. Cuando se aíslan de otras especies vegetales como *Lupinus* y otras leguminosas tropicales se denominan *Bradyrhizobium* spp. Sin embargo, en base a la homología de ADN se le atribuyen a este género tres subgrupos (Schola *et al.*, 1990) habiéndose descrito el *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) que algunos lo consideran otra especie de *Rhizobium* (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995), *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) y *Bradyrhizobium tianshanense* (Chen *et al.*, 1993) todas ellas como especies nuevas.

Género *Sinorhizobium*. Género propuesto para la antigua especie *Rhizobium fredii* que agrupa a bacterias de crecimiento rápido capaces de nodular a *Glycine*. Este nuevo género incluye dos especies: *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium xingianensis* (Chen *et al.*, 1988).

Género *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) Incluye la especie *Azorhizobium caulinodans* que forma nódulos fijadores en raíz y tallo de *Sesbania rostrata*. Recientemente se han aislado bacterias de nódulos procedentes de tallos fotosintéticos de distintas especies de *Aeschynomene* que pertenecen a este género (Eaglesham *et al.*, 1990), sin embargo aun cuando filogenéticamente estas bacterias se parecen más a *Bradyrhizobium* que a *Azorhizobium* (Young, 1992), en un estudio realizado por Ladha y So (1994) proponen un nuevo género y especie *Photorhizobium thompsonianum*. Estas bacterias producen bacterioclorofila a tanto fuera como dentro de los nódulos, habiéndose realizado estudios filogenéticos entre diversas cepas formadoras de bacterioclorofila en nódulos caulinares (Wong *et al.*, 1994)

Género *Phyllobacterium* forma nódulos en hojas de especies de la familia *Myrsinaceae* y *Rubiaceae* (Lambert *et al.*, 1990). La fijación de nitrógeno en estos nódulos no está confirmada.

Género *Agrobacterium* origina la aparición de tumores en plantas y recientemente se ha demostrado la fijación de nitrógeno en *Agrobacterium tumefaciens* (Kanvinde y Sastry, 1990).

En la revisión de van Rhijn y Vanderleyden (1995) se considera que existen tres géneros: *Rhizobium* con 10 especies, *Bradyrhizobium* con 3-5 especies y *Azorhizobium* con una.

Los estudios de homología de ADN y análisis del ARN ribosómico (5S, 16S y 23S) demuestran que *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* no están relacionados entre sí, en cambio entre *Rhizobium* y *Agrobacterium* se presenta una estrecha correlación al igual que sucede entre *Bradyrhizobium* y *Rhodopseudomonas* (Young, 1992). Los datos de hibridación del r-RNA indican que *Azorhizobium* está más relacionado con *Xantobacter* y *Agrobacterium* que con *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988).

Tabla 1.1. Estado actual de la taxonomía de la familia *Rhizobiaceae*

Géneros descritos	Especies descritas	Referencias	Planta huésped
<i>Rhizobium</i> (Frank, 1889)	<i>R. leguminosarum</i>	Jordan (1982)	<i>Pisum, Vicia, Lens, Lathyrus</i> (bv. <i>viciae</i>) <i>Phaseolus</i> (bv. <i>phaseoli</i>) <i>Trifolium</i> (bv. <i>trifolii</i>) <i>Melilotus, Medicago, Trigonella</i> <i>Lotus, Cicer, Robinia, Mimosa, Lupinus</i>
	<i>R. meliloti</i>	Jordan (1982)	<i>Melilotus, Medicago, Trigonella</i>
	<i>R. loti</i>	Jordan (1982)	<i>Lotus, Cicer, Robinia, Mimosa, Lupinus</i>
	<i>R. galegae</i>	Lindström (1989)	<i>Galega</i>
	<i>R. kuakuii</i>	Chen <i>et al.</i> (1991)	<i>Astragalus</i>
	<i>R. etlii</i>	Segovia <i>et al.</i> (1989)	<i>Phaseolus</i>
	<i>R. tropici</i>	Martínez <i>et al.</i> (1991)	<i>Phaseolus</i>
	<i>R. ciceri</i>	Nour <i>et al.</i> (1994)	<i>Cicer</i>
	<i>R. fredii</i>		<i>Glycine</i>
<i>Bradyrhizobium</i> (Jordan, 1982)	<i>B. japonicum</i>	Jordan (1982)	<i>Glycine, Vigna</i>
	<i>B. elkanii</i>	Kuykendall <i>et al.</i> (1992)	<i>Glycine</i>
	<i>B. liaoningense</i>	Xu <i>et al.</i> (1995)	<i>Glycine</i>
	<i>B. thianshanense</i>	Chen <i>et al.</i> (1993)	<i>Glycyrrhiza, Sophora, Caragana, Glycine</i>
	<i>B. sp.</i>		<i>Cicer</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. fredii</i>	Chen <i>et al.</i> (1988)	<i>Glycine</i>
	<i>S. xingianensis</i>	Chen <i>et al.</i> (1988)	
<i>Azorhizobium</i> (Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)	<i>A. caulinodans</i>	Dreyfus <i>et al.</i> (1988)	<i>Sesbania</i>
<i>Photorhizobium</i>	<i>P. thompsonianum</i>	Ladha y So (1994)	
<i>Phyllobacterium</i>		Lambert <i>et al.</i> (1990)	<i>Myrsinaceae, Rubiaceae</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Kanvinde y Sastry (1990)	

4. Proceso de nodulación.

4.1. El nódulo.

Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* infectan las células corticales de las raíces de leguminosas y dan lugar a la formación de nódulos. El proceso de nodulación ha sido revisado recientemente (Hirsch, 1992; Brown y Walsh, 1994; Fischer, 1994; Carlson *et al.*, 1995; Cook, 1995; Mylova *et al.*, 1995). Se puede resumir en tres etapas: a) especificidad o estado de preinfección, b) infección y formación del nódulo, en la que se incluyen la unión de *Rhizobium* al pelo radical, la deformación de este, la iniciación y la elongación del cordón de infección y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del córtex radical, c) efectividad o funcionamiento del nódulo.

El desarrollo de los nódulos ha sido caracterizado por Vincent (1980) en una serie de etapas secuenciadas e independientes. Se le han asignado códigos fenotípicos, que pueden estar influenciados por uno o más genes (Appelbaum, 1990) y, posteriormente, ha sido revisado por Caetano-Anollés y Gresshoff (1991). Este proceso involucra además de la etapa de preinfección, otros dos eventos independientes, la infección (invasión) y el desarrollo del nódulo, en el que se incluye la división celular, la diferenciación y la funcionalidad. El proceso de infección incluye: La unión al pelo radical (**Roa**), la deformación de estos (**Hac**), la iniciación y elongación del cordón de infección (**Inf**) y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del córtex radical (**Bar**).

La infección de las leguminosas por *Rhizobium* ocurre a través de tres vías alternativas: A través del pelo radical, la más usual, a través de las heridas (Pueppke, 1986) y por las células epidérmicas, descrita por Faria *et al.* (1988). La naturaleza química y física de la pared celular del pelo radical es probablemente un factor crítico para determinar la vía de infección (Sequeira, 1986).

Además, en la infección hay que considerar tres aspectos claves: 1) Producción de fitoalexinas y otros compuestos producidos por la planta. Phillips y Kapulnik (1995) han identificado catorce flavonoides y dos betainas en exudados de raíz de alfalfa y han examinado la capacidad de estos compuestos de inducir la transcripción de genes específicos de la nodulación, *nod*. Coopers *et al.* (1995) demuestran que el *Rhizobium* puede metabolizar a los flavonoides inductores de genes *nod*, produciendo tres grupos de metabolitos que son activos en el diálogo molecular entre planta y bacteria. 2) Pro-

ducción de polisacáridos extracelulares por *Rhizobium*. Al menos existen cuatro tipos que son degradados por enzimas celulolíticas y pectolíticas (Martínez-Molina y Olivares, 1982). Concretamente, las moléculas de lipo-chitin-oligosacáridos (LCO) constan de una parte central que es un tetrámero, pentámero o hexámero de N-acetilglucosamina, un ácido graso altamente insaturado e hidrofóbico y un sustituyente en el final reductor que puede variar desde un resto molecular simple, el acetilo a otros más complejos como el 2-O-fucosil metilo (Stacey *et al.*, 1995; Spaink *et al.*, 1995). 3) La producción de proteínas no relacionadas con la biosíntesis y secreción de factores NOD, como la nod O descrita por Downie *et al.* (1995), con una función aparentemente complementaria a la de los LCO y relacionada con la formación de canales y/o poros en membranas.

En consecuencia, con la liberación de quimioattractantes por las plantas y con las señales inducidas por los genes *nod* (Schultze *et al.*, 1994; Debelle *et al.*, 1995) que actúan como señales específicas producidas por *Rhizobium*, se induce el proceso de infección y el crecimiento y el metabolismo de las células nodulares en la raíz (Hirsch *et al.*, 1995). Una o más de estas señales moleculares es un mitógeno específico que probablemente actúe influyendo en el balance hormonal endógeno (Ligero *et al.*, 1991; Hirsch y Fang, 1994).

Paralelamente al proceso de infección, algunas células del córtex radical se diferencian para dar lugar a la iniciación del nódulo (**Noi**). Esto implica el inicio de la mitosis cortical, formación del meristemo nodular y desarrollo de la estructura del nódulo. Ambos procesos, tanto la infección como el desarrollo del nódulo, se inician a las pocas horas de haberse puesto en contacto la bacteria con la raíz. Las últimas etapas de la simbiosis incluyen la diferenciación de la bacteria en bacteroide (**Bad**), quedando confinado en vesículas rodeadas por la membrana peribacteroidal, la síntesis de nitrogenasa (**Nif**) y otros metabolitos codificados por genes requeridos para la fijación (**Cop**) y la persistencia del nódulo (**Nop**).

Cada una de las etapas sucesivas de la formación del nódulo está marcada por la expresión de los genes nodulares específicos de las plantas que codifican a proteínas denominadas **nodulinas**. Los genes que se expresan antes de iniciarse la fijación de nitrógeno originan las **nodulinas tempranas**, mientras que los que se expresan al mismo tiempo que la fijación de nitrógeno se denominan **nodulinas tardías**. No hay duda de que los factores nod inducen la expresión de nodulinas que se expresan en el interior del córtex de la raíz y/o en el primordio nodular cuando se inicia la división celular (Vign *et al.*, 1993; 1995). En la actualidad numerosas revisiones analizan los

cambios en la expresión de genes específicos de la raíz que se inducen con la nodulación producida por el *Rhizobium* (Franssen *et al.*, 1995; Folch-Mallol *et al.*, 1996).

Se han descrito dos tipos de nódulos en las leguminosas, **nódulos determinados** y **nódulos indeterminados** que difieren en su morfología, en la estructura y desarrollo del cordón de infección (Rae *et al.*, 1992), en su funcionamiento, en la presencia o no de meristemo apical y en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent *et al.*, 1989). Las leguminosas de zonas templadas como *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium* y *Medicago* desarrollan nódulos indeterminados, mientras que las leguminosas de zonas tropicales, *Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna*, etc. presentan nódulos determinados.

Los **nódulos indeterminados** están formados por un meristemo indeterminado situado en el ápice. Son elongados, pleomórficos (Fig. 1.2), con tejido vascular y endodermis abierta. Las etapas de desarrollo del nódulo están separadas en el espacio y no en el tiempo (Nap y Bisseling, 1990), coexistiendo a la vez división celular (zona I), elongación e incluso senescencia en cuatro zonas diferentes. La senescencia (zona IV) se inicia en la zona opuesta al ápice en la base del nódulo. El cordón de infección es ancho. Se considera en este tipo de nódulos que las células infectadas pueden constituir el 100% del espacio nodular. El nitrógeno asimilado se transporta en forma de asparagina mayoritariamente.

Utilizando hibridación *in situ* se ha demostrado que la transición de una zona a otra está acompañada por la expresión de nodulinas específicas y también de genes bacterianos que marcan los diferentes estados de desarrollo. La expresión de una nodulina tardía, la leghemoglobina empieza en la zona de infección II y alcanza su máximo en la zona de fijación de nitrógeno III. En la transición de la zona II a la III se inducen los genes *nif* del *Rhizobium* en el bacteroide estableciéndose la eficiente fijación de nitrógeno en los bacteroides en la zona III (Yang *et al.*, 1994).

Los **nódulos determinados** se originan de un meristemo determinado, son globosos, con canales vasculares fusionados en el ápice formando un bucle que conecta con el haz vascular en la base del nódulo. Esta disposición de los haces vasculares le permite un mayor flujo de agua procedente de la transpiración, a través del nódulo. Cuando cesa la actividad mitótica del meristemo se inicia la elongación celular. Por tanto las etapas del desarrollo del nódulo están separadas en el tiempo (Nap y Bisseling, 1990). El cordón de infección es estrecho. La endodermis está cerrada al

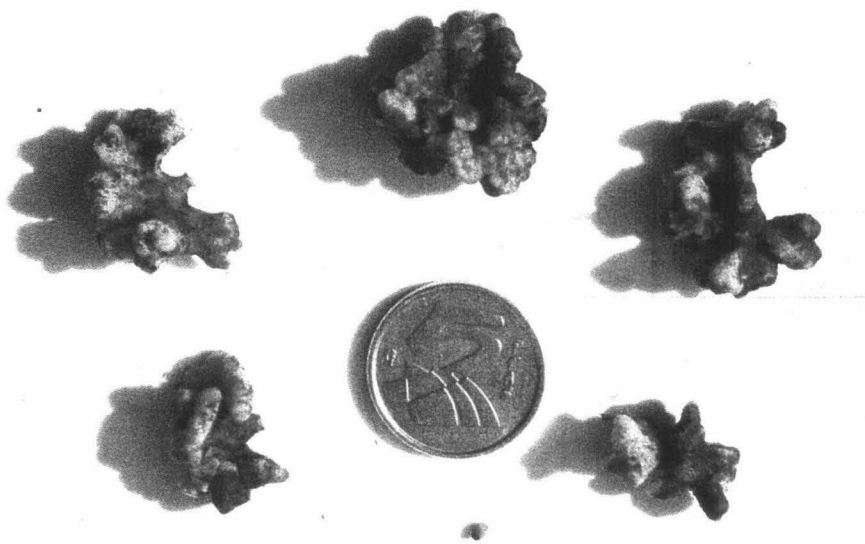


Fig. 1.2. Nódulos radicales de plantas de *Vicia faba* cultivadas en campo.

igual que el tejido vascular, xilema y floema. La senescencia se inicia en el centro del nódulo.

Las células no infectadas del nódulo se encuentran entremezcladas con las células que contienen bacteroides (células infectadas) y se denominan también células intersticiales. Estas células han sido consideradas poco significativas en el proceso de fijación de nitrógeno. Tácitamente se asumía que habían "escapado" de la infección y simplemente servían de soporte en la función del nódulo. Sin embargo, por estudios de ultraestructura y localización citoquímica, se ha demostrado que existe una compartimentación celular entre los dos tipos de células, de las secuencias metabólicas que conlleva la biosíntesis de ureidos, producto prioritario procedente del nitrógeno asimilado (Lluch, 1991; Hansen *et al.*, 1995; Aveline *et al.*, 1995).

4.2. El simbiosoma.

El término simbiosoma, acuñado por Roth *et al.* (1988) define a las organelas endosimbióticas en general. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa vendría definido por el **bacteroide**, el **espacio peribacteroidal** (EPB) y la **membrana peribacteroidal** (MPB) como unidad funcional o **unidad peribacteroidal** (UPB). Sin embargo, Smith y Smith (1990) han criticado esta terminología.

En estado endosimbiótico las bacterias se diferencian en bacteroides. Su forma y tamaño pueden ser diferentes a la forma en vida libre como en el género *Bradyrhizobium*, o irregulares y ramificadas como frecuentemente ocurre en las biovariedades del género *Rhizobium*. El ADN contenido en los bacteroides por célula puede ser de 4 a 8 veces el contenido en *Rhizobium* en estado de vida libre (Bisseling *et al.*, 1977). Esto es debido a la forma multicelular de los bacteroides que incrementan su tamaño sin división celular. En *Bradyrhizobium japonicum* se ha demostrado que el contenido de ADN por unidad de volumen celular en ambas formas es el mismo (Paau *et al.*, 1979). El número de UPBs rodeadas por la misma MPB está bajo control de la planta huésped, habiéndose descrito bacteroides simples formados por una sola bacteria en nódulos de *Lupinus* y *Medicago* y con varias bacterias en nódulos de *Glycine* y *Phaseolus* (Miller *et al.*, 1988).

4.2.1. Espacio peribacteroidal.

El espacio peribacteroidal no está aparentemente lleno pero contiene, cercano al bacteroide, otros componentes distintos al citosol vegetal. La composición bioquímica en este compartimento implica una contaminación cruzada del vegetal (citosol, mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, etc.) mientras que puede excluirse la contaminación por parte del periplasma y citoplasma bacteroidal (King *et al.*, 1986). Se han identificado los siguientes componentes: α -manidasas-II (Kinnback y Werner, 1987), proteasas (Mc Parland *et al.*, 1976), inhibidores de proteasas (Garbers *et al.*, 1988), aspartato aminotransferasa, α -glucosidasas y fosfatasas ácidas (Kinnback y Werner, 1990) y trehalasas (Meller, 1968). El espacio puede ser acidificado por dos tipos de transportadores: la ATP-asa bacterial que cataliza el transporte de protones al EPB (Blumwald *et al.*, 1985) y el transportador de dicarboxilatos (Day *et al.*, 1990). Además, si el bacteroide es fijador de nitrógeno activo, el pH se puede modificar con la absorción de malato/succinato y por la excreción del amonio.

Sin embargo, de Felipe *et al.* (1995) utilizando la técnica de "High pressure freezing", que logra la crioinmovilización de todos los componentes del tejido, en nódulos de *Lupinus albus* y de *Phaseolus vulgaris* demuestran la inexistencia del espacio peribacteroidal, al estar la MPB y la membrana del bacteroide estrechamente unidas. Estos estudios abren nuevas perspectivas en la consideración del EPB, pudiendo cuestionar aspectos anteriormente comentados.

4.2.2. Membrana peribacteroidal (MPB).

La membrana peribacteroidal es producida por la planta mediante el flujo de vesículas de membrana desde el aparato de Golgi y/o directamente del retículo endoplásmico (Brewin *et al.*, 1987). Sin embargo, se requieren al menos cuatro señales del microsimbionte para la síntesis de la MPB (Meller *et al.*, 1989). En el proceso de diferenciación coexisten la acción de señales específicas de la planta huésped combinada con factores microambientales como baja presión de oxígeno, altas concentraciones de potasio y pH ácido (Kannenberg y Brewin, 1989). Esta membrana es necesaria para la efectividad de la simbiosis; en simbiosis poco efectivas está ausente, desintegrada o poco desarrollada (Arwas *et al.*, 1985).

Algunas de las características de la composición de la MPB inducen a considerarla como una verdadera estructura simbiótica. Así, la relación lípido/proteína es 6/1 (Robertson *et al.*, 1978b) lo que supone que los compuestos hidrofílicos difunden más lentamente. También se ha comprobado que hay cuarenta veces más MPB que plasmalema (Verma *et al.*, 1978) lo que indica el papel importante que tiene en el transporte de metabolitos entre citoplasma y bacteroide. La composición de fosfolípidos y ácidos grasos es semejante a la del retículo endoplásmico (Meller *et al.*, 1985). La secuencia de polipéptidos no muestra ninguna homología con otras membranas celulares (Meller y Werner, 1986).

Se han aislado e identificado diversas proteínas que condicionan las funciones específicas de la MPB, algunas de ellas propuestas como nodulinas. Concretamente, en la MPB de nódulos de soja se han descrito tres nodulinas: la Ngm-24 localizada en la membrana en dirección al espacio peribacteroidal, por lo que no participan en funciones de transporte (Fischer y Hennecke, 1987); la Ngm-23 considerada como miembro de una pequeña familia de cinco genes (Jacobson *et al.*, 1990) y la Ngm-26 proteína intrínseca de membrana relacionada con el transporte de pequeñas moléculas a través de la MPB. Se considera que Ngm-26 es la mayor proteína fosforilada de la MPB y el gen que la codifica ha sido descrito por Forlin *et al.* (1987). La incubación con fosfatasa alcalina exógena revierte la fosforilación de esta proteína (Ou Yang *et al.*, 1991) e inhibe el transporte de malato. Ambos efectos se revierten con la adición de ATP. Estos resultados inducen a pensar que el transportador de dicarboxilatos que funciona en la MPB podría estar regulado por un proceso de fosforilación/defosforilación proteica. Day y Udvardi (1992) identifican al transportador de dicarboxilatos con la Ngm-26 y Weaver *et al.* (1991) demuestran que la fosforilación de esta proteína está mediada por el calcio e incluso se ha propuesto que esta proteína formaría, o actuaría a modo de, un canal proteico (Miao y Verma, 1993) de tipo aniónico (Weaver *et al.*, 1994).

Se ha detectado la presencia de H⁺-ATPasas del tipo plasmalema (Udvardi y Day, 1989) y probablemente otra del tipo tonoplasto, en base a su inhibición por el nitrato aun cuando su comportamiento ante el vanadato lo cuestiona (Udvardi y Day, 1989). Day *et al.* (1990) determinan otras propiedades de la ATPasa, su pH óptimo es 6.5, K_m = 80 μm, no es inhibida significativamente por el molibdeno, oubaina, azida y oligomicina y se estimula con el KCl. También se ha descrito una actividad pirofosforilasa dependiente del magnesio. Recientemente Szafran y Haakeer (1995) describen que la actividad ATPasa asociada a la MPB puede actuar como regulador

de la actividad nitrogenasa.

4.2.3. Permeabilidad de la MPB.

El transporte de sacarosa, glucosa y fructosa a través de la MPB es lento, pasivo, en favor de un gradiente de concentración y con velocidades inadecuadas para mantener la actividad nitrogenasa (Udvardi *et al.*, 1990). La absorción de azúcares por los bacteroides se inhibe por el malato y succinato. Además no constituyen fuente de energía para los bacteroides puesto que estos carecen de invertasa alcalina (Reibach y Streeter, 1981) y los niveles de las enzimas oxidativas de la glucólisis y de la vía de las pentosas fosfato son muy bajos (Copeland *et al.*, 1989). Hay solo una excepción en *Phaseolus vulgaris*. Herrade *et al.*, (1989) demostraron que la glucosa estimula la actividad nitrogenasa en bacteroides aislados de judía. Otra excepción es el caso de *Rhizobium tropici* que manifiesta una activa absorción de sacarosa (Romanov y Martínez-Romero, 1994) y al comparar los perfiles enzimáticos de la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos en bacteroides se sugiere la posibilidad de utilizar dicarboxilatos o azúcares en el nódulo (Romanov *et al.*, 1994).

Principalmente malato, succinato y fumarato se absorben rápidamente por los bacteroides, estimulan su respiración y se emplean como sustrato para llevar a cabo en condiciones *in vitro* la fijación de nitrógeno (Streeter, 1987). El malonato es transportado lentamente a través de la membrana (Ou Yang *et al.*, 1990) y no es un sustrato potencial. No obstante el malonato se acumula en concentraciones muy elevadas en el citosol nodular, no es absorbido por los bacteroides (Streeter, 1987; Rosendahl *et al.*, 1990) y su función es desconocida. Además, los simbiosomas de *Glycine max* son más selectivos y no transportan glutamato (Ou Yang *et al.*, 1990).

La absorción de los ácidos dicarbónicos al interior del bacteroide se lleva a cabo por un doble sistema, uno pasivo a favor de la elevada concentración de esos metabolitos en el citosol nodular y otro activo mediante una proteína transportadora. Se asume que existe un transporte de ácidos dicarbónicos al bacteroide mediado por un influjo activo (Appleby, 1984; O'Brian y Maier, 1989). El sistema de transporte activo para los ácidos dicarbónicos es constitutivo e idéntico para el malato, succinato y fumarato (Glenn *et al.*, 1984) ya que está formado por una única permeasa codificada por el gen *dctA* (San Francisco y Jacobson, 1986).

Sin embargo, estudios genéticos recientes han demostrado la existencia de tres genes (Jarding *et al.*, 1994): El gen *dctA* es absolutamente necesario para la fijación

de nitrógeno (van Slooten *et al.*, 1992) y predice la orientación de la proteína DctA en la MPB (Jarding y Puhler, 1993). La expresión del gen *dctB* es constitutiva y el producto del gen tiene una actividad fuertemente autofosforilante (Giblin *et al.*, 1995). Por último el gen *dctD* cuya proteína es controlada por la proteína DctB (Lee *et al.*, 1994).

La fuerza que dirige el funcionamiento del transportador de dicarboxilatos en la MPB es sin duda una bomba de protones dependiente del ATP según se deduce de los resultados descritos por Udvardi *et al.* (1991) y Ou Yang y Day (1992).

5. Metabolismo del nódulo.

5.1. Nitrogenasa.

Bergersen y Turner (1967) demostraron que la fijación de nitrógeno tiene lugar en los bacteroides. La capacidad de fijar nitrógeno se debe a la actividad de un complejo enzimático llamado nitrogenasa. La caracterización, propiedades y homología genética del enzima de las más de treinta especies diazotrofas en las que se ha aislado son semejantes. El complejo enzimático consta de dos componentes: el componente I, una molibdoferroproteína o nitrogenasa y el componente II, que es una ferroproteína denominada nitrogenasa reductasa. El centro activo del enzima es un cofactor con hierro y molibdeno denominado **FeMoco** (Imperial *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1995). La actividad viene determinada por: la existencia de los dos componentes, ATP-Mg⁺⁺, donadores de electrones y un sistema de protección frente al oxígeno. Normalmente como donadores de electrones para el enzima *in vivo* actúan la ferredoxina y flavodoxina (Gallon y Chaplin, 1987), que proporcionan los equivalentes de reducción necesarios para reducir al nitrógeno. El mecanismo de transferencia de electrones ha sido descrito por Lowe *et al.* (1995) mediante un proceso endergónico que requiere un mínimo de energía de 960 kJ por mol de nitrógeno fijado. De ahí que se requieran 16 moléculas de ATP hidrolizadas por los 8 electrones transportados a través del complejo nitrogenasa (Pate y Layzell, 1990). La estructura y el funcionamiento de la nitrogenasa ha sido revisada por Peters *et al.* (1995), Howard (1995) y Smith *et al.* (1995) entre otros autores.

También se ha descrito la existencia de una nitrogenasa independiente de molibdeno y dependiente de vanadio (Bishop *et al.*, 1980; Robson *et al.*, 1986) denominada nitrogenasa-2, cuyo centro activo es el **FeVaco**. Asimismo se ha

encontrado una nitrogenasa-3, dependiente de hierro como único metal en el centro activo del enzima, **FeFeco** (Bishop, 1990; Wangh *et al.*, 1995).

La capacidad de fijar nitrógeno está regulada por la expresión de los genes llamados *nif*. El estudio de estos genes se ha realizado fundamentalmente en *Klebsiella pneumoniae* que ha servido como modelo para el estudio de los genes *nif* en el resto de diazotrofos. En (*Brady*)*rhizobium*, además de los genes *nif*, se han caracterizado otros genes necesarios para la fijación simbiótica de nitrógeno que no presentan homología con los genes *nif*. Tal es el caso de los genes integrados en el operón *fix ABCX* (Earl *et al.*, 1987), de los que se especula puedan constituir una cadena de transporte electrónico para la nitrogenasa (Evans *et al.*, 1988). En la mayoría de las bacterias del género *Rhizobium*, los genes *nif* y *fix* se localizan en plásmidos de elevado peso molecular, llamados **pSym**, junto a otros muchos genes implicados en el proceso de infección y nodulación del correspondiente hospedador. No ocurre así en *Bradyrhizobium*, donde todos estos genes tienen localización cromosómica. Otros aspectos de la genética del *Rhizobium* son recogidos por Michels y Vanderleyden (1994), Hynes *et al.* (1995), Palacios *et al.* (1995), Soupena *et al.* (1995) y Sanjuan *et al.* (1995).

5.2. Metabolismo del hidrógeno.

La nitrogenasa de todos los diazotrofos en los que se ha estudiado reduce protones a hidrógeno, concomitantemente con la reducción de nitrógeno a amonio. Bulen y LeCompte (1966) describieron este hecho por primera vez en extractos de *Azotobacter* y demostraron que el proceso es dependiente del ATP. El mecanismo más aceptado para explicar esta producción de hidrógeno fue propuesto inicialmente por Chatt (1980) y revisado posteriormente por Thorneley y Lowe (1985). El modelo predice una estequiometría de un mol de hidrógeno producido por mol de nitrógeno fijado, lo que implica que el 25% de los electrones que pasan a través de la nitrogenasa se desvían y en consecuencia es una fuente de ineficiencia de esta actividad (Schubert y Evans, 1976; Dixon *et al.*, 1981).

La presencia de un sistema con capacidad de oxidar el hidrógeno independiente de la nitrogenasa (fenotipo Hup), se ha demostrado en algunas cepas de *Bradyrhizobium* spp. (Dadarwal *et al.*, 1985), *B. japonicum* (Jim *et al.*, 1981), *R. meliloti* (Ruíz-Argüeso *et al.*, 1979), *R. leguminosarum* biovar. *viciae* (Truelsen y Wyndale, 1984), en *R. astragalus* (Sun *et al.*, 1988), en *Azorhizobium caulinodans* (Stam *et al.*,

1984) y en *Frankia* spp. (Sellstedt, 1989).

Puesto que ambas enzimas, nitrogenasa e hidrogenasa, están involucradas en el metabolismo del hidrógeno en los nódulos radicales, el nivel de esta molécula en el nódulo es difícil de evaluar cuantitativamente. Esto indujo a Schubert y Evans (1976) a definir el término de **eficiencia relativa**, que relaciona el desprendimiento de H_2 con el flujo de electrones a través de la nitrogenasa. El valor de la eficiencia relativa se identifica con la eficiencia del sistema fijador de nitrógeno. El máximo valor es 1 y significa que no hay liberación de hidrógeno. Para un sistema que carece de hidrogenasa su máximo valor teórico es 0.75, por tanto valores entre 0.75 y 1 indican que alguna hidrogenasa está presente aunque no lo suficientemente eficiente para consumir todo el hidrógeno (Evans *et al.*, 1981; Simpson y Burris, 1984).

A esta actividad se le atribuyen diversas funciones, todas ellas beneficiosas para la fijación de nitrógeno (Dixon, 1972). Por una parte, elimina el hidrógeno que puede desactivar la nitrogenasa, aún cuando se cuestionan dos hechos: que la concentración de hidrógeno alcanzada sea lo suficientemente elevada y que existan barreras en el medio que impidan su difusión. Sin embargo los datos encontrados de K_i del hidrógeno para inhibir la reducción de nitrógeno (Rasche y Arp, 1989) así como las concentraciones de ambos gases en el interior del nódulo (Hunt *et al.*, 1988) postulan esta función como correcta. Por otra parte, el potencial redox de la oxidación del hidrógeno es lo suficientemente bajo, -420 mv, como para que se pueda utilizar como fuente adicional de poder reductor y energía para el sistema fijador de nitrógeno. La oxidación del hidrógeno acoplada a la formación de ATP ha sido descrita por Dixon (1968) y Nelson y Salminen (1982), entre otros. Por último la eliminación de hidrógeno está acoplada al consumo de oxígeno, con lo que se protege a la nitrogenasa de este. De esta manera se favorece el mecanismo de "protección respiratoria", presente en bacterias fijadoras de nitrógeno en aerobiosis. Esta protección respiratoria no ha sido demostrada en nódulos intactos (Serraj *et al.*, 1992; Delgado *et al.*, 1992).

La hidrogenasa ha sido aislada de numerosos microorganismos (O'Brian y Maier, 1988) y purificada a homogeneidad de bacteroides (Arp, 1985) y de células quimioautotróficas (Harker *et al.*, 1984). La enzima es una metaloproteína de localización citoplásmica unida a membranas, con un peso molecular nativo de 100 kDa y dos subunidades de 65 y 35 kDa. Contiene Ni y Fe en una relación 1/10. Posee dos centros 4Fe-4S, un centro 3Fe-4S en la subunidad pequeña y un centro con Ni en la subunidad grande. El donador de electrones endógeno es desconocido, pudiendo actuar el azul de metileno y el bencil viológeno como donadores exógenos. Los

inhibidores de la enzima son el CO (Arp y Burris, 1981), el acetileno (Hyman y Arp, 1987) y el oxígeno (Seefeldt y Arp, 1989). Como inactivadores actúan el oxígeno y la cianida (Seefeldt y Arp, 1989).

Respecto al funcionamiento fisiológico y genético de la nitrogenasa, se puede indicar que esta enzima, por sí misma, no es capaz de transferir los electrones del hidrógeno al oxígeno directamente. Eisbrener y Evans (1983) proponen la cadena transportadora de electrones en esta transferencia. Profundizando en esta posibilidad se han realizado diversos estudios, como los de Emerich *et al.* (1979) y O'Brian y Maier (1985).

Los 18 genes de la hidrogenasa se han designado como genes *hup*. En *Bradyrhizobium japonicum* los genes *hup* no parecen estar asociados a un plásmido (Cantrell *et al.*, 1982), mientras que en *R. leguminosarum* están localizados en el plásmido *sym* (Palacios *et al.*, 1988) de 15 kb organizadas en seis unidades transcripcionales designadas como regiones *hup*, desde la I hasta la VI; todas ellas se transcriben en la misma dirección (Ruíz-Argüeso *et al.*, 1991; Rey *et al.*, 1993). Los genes estructurales de la hidrogenasa de *B. japonicum* están localizados en un operón simple (Sayavedra-Soto *et al.*, 1988). Otros genes que involucran la incorporación del níquel al apoenzima (Rey *et al.*, 1994) y otras proteínas accesorias para la hidrogenasa se encuentran en otro operón. Al comparar la secuencia de los genes que codifican la hidrogenasa de distintos microorganismos se observa una gran homología (Hidalgo *et al.*, 1992). Sin embargo, al transferir el cósmido pHU52 que contiene el genoma de la hidrogenasa a cepas de *R. meliloti* y *R. trifolii*, solo se detecta una actividad hidrogenasa pequeña, indicando que el fenotipo Hup no se ha integrado establemente en el cromosoma del huésped (Lambert *et al.*, 1987). Estos resultados han sido cuestionados y perfeccionados por Leyva *et al.* (1990), por Ruíz-Argüeso *et al.* (1992) y Manso *et al.* (1995).

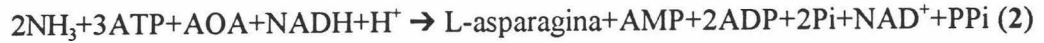
5.3. Energía de la fijación de nitrógeno.

La nitrogenasa reduce el nitrógeno atmosférico a amonio de acuerdo con la siguiente ecuación (Appleby, 1984):



Los requerimientos energéticos de esta reacción, que ocurre en el bacteroide, son suplidos por la planta hospedadora (Fig. 1.3). Además, la asimilación de amonio,

representada en la ecuación (2), también consume ATP y equivalentes de reducción. Los nódulos, por tanto, requieren energía que es aportada por el fotosintato.



La relación existente entre fotosíntesis y fijación de nitrógeno es un hecho ampliamente asumido (Deroche, 1983). De hecho, la capacidad de fijar nitrógeno de la asociación simbiótica puede modificarse mediante aquellos factores que favorecen o inhiben el proceso fotosintético. Así, incrementando la intensidad de luz, el área foliar o la concentración de dióxido de carbono alrededor de los ápices (Emerich *et al.*, 1983) la fijación de nitrógeno y el peso de los nódulos aumenta. Por otra parte, disminuyendo la fotosíntesis a través de la defoliación, el sombreado o por la aplicación de inhibidores (Bethlenfalvay *et al.*, 1979) se producen bajos niveles en la tasa de reducción de acetileno. Resultados análogos encontraron Bedmar y Olivares (1980)

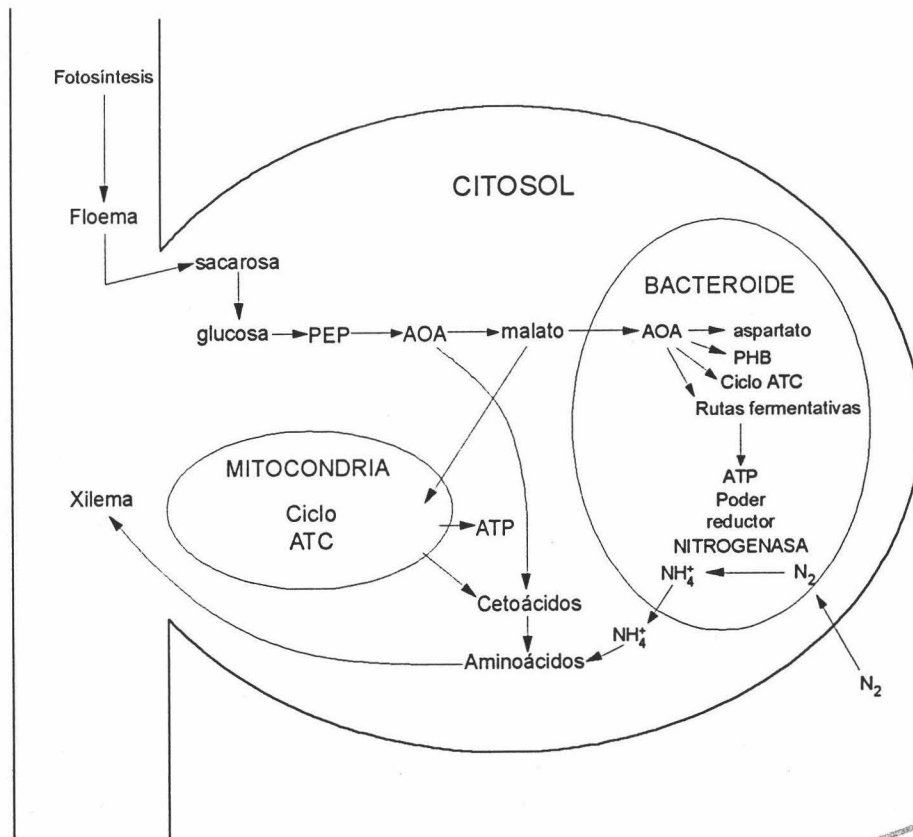


Fig. 1.3. Metabolismo general del nódulo.



utilizando inhibidores químicos de la fotorrespiración. El fotosintato se utiliza como fuente de energía y esqueletos carbonados en: **a)** el crecimiento y mantenimiento del nódulo; **b)** la obtención de energía en forma de ATP y poder reductor para la fijación; **c)** la asimilación del amonio y **d)** el posterior transporte de sus productos (Schubert, 1986).

Algunas investigaciones sugieren que los nódulos de las leguminosas necesitan aproximadamente entre 5 y 18 gramos de carbohidratos por gramo de nitrógeno fijado (Streeter, 1991; Vance y Heichel, 1991). En base a 12 g de carbono por g de nitrógeno fijado Streeter (1991) ha calculado que aproximadamente 1.5 Tm de sacarosa/Ha deben ser consumidas para mantener la fijación de nitrógeno en el cultivo de soja, considerando a la sacarosa el principal compuesto carbonado transportado por el floema hasta los nódulos (Kouchi y Nakaji, 1985). Gordon (1993) determina que entre el 40-50% del fotosintato diario se procesa en el nódulo y aproximadamente el 50% de este se pierde como dióxido de carbono respirado

La diversificación del fotosintato entre los bacteroides, lugar de localización exclusivo de la nitrogenasa, y el citosol vegetal está condicionado por: **a)** la existencia de una doble barrera, la membrana del bacteroide y la membrana peribacteroidal entre estos y la planta huésped, **b)** por las diversas fuentes carbonadas existentes, su ruta de transformación y su variación en el tiempo y **c)** por las diferentes cepas bacterianas (Meller y Werner, 1990).

De todos los metabolitos disponibles en el bacteroide los ácidos dicarboxílicos se consideran los metabolitos carbonados que suministran la energía que necesita la nitrogenasa. El uso de mutantes de *Rhizobium* de rápido crecimiento que carecen de sistema transportador de dicarboxilatos (dct) produciendo nódulos inefectivos (fix⁻) (Arwas *et al.*, 1985; Humbeck y Werner, 1989), junto con la estimulación de la respiración en bacteroides por compuestos carbonados (Tajima *et al.*, 1986; Delgado *et al.*, 1993) y los experimentos llevados a cabo sobre la permeabilidad de la membrana peribacteroidal con una absorción de ácidos dicarboxílicos 50 veces más activa que la de azúcares (Salminen y Streeter, 1987) han demostrado la utilización preferencial de los ácidos dicarboxílicos, malato y succinato, por los bacteroides. Estos ácidos dicarboxílicos son oxidados por medio de las cadenas de transporte electrónico de los bacteroides que terminan en oxidasas de alta afinidad (Kahn *et al.*, 1995).

La fijación de nitrógeno, como todo proceso sintético, impone una carga energética a la planta (Vance y Heichel, 1991) lo que puede suponer una limitación a

la productividad de las leguminosas.

5.4. Metabolismo del carbono.

5.4.1. Contenido de metabolitos.

Experimentos realizados en nódulos de *Phaseolus vulgaris* por Antoniwi y Sprent (1978) con ^{14}C demostraron que la sacarosa, procedente del fotosintato, es el carbohidrato mayoritario en el citosol nodular. También está presente glucosa, fructosa y en menor proporción maltosa, trehalosa y ciclitoles como mioinositol, chiroinositol, D-pinitol y ononitol (Streeter, 1987a; Lafontaine *et al.*, 1985).

En nódulos de *Glycine max*, Streeter (1985) ha determinado la concentración de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos. En el citosol del nódulo, la sacarosa es el principal componente seguido del mioinositol, chiroinositol, pinitol, glucosa, malato, aspartato y glutamato. En el bacteroide, el mioinositol es el más abundante seguido del chiroinositol, trehalosa, sacarosa, aspartato, glutamato, pinitol, arginina, malato y glucosa.

También se han analizado nódulos de *Lupinus* spp. (Golvano *et al.*, 1991), en ellos los metabolitos carbonados se acumulan en el siguiente orden: malato, sacarosa, glucosa, piruvato, fosfoenolpiruvato, oxalacetato y fructosa.

En nódulos de *Medicago sativa* los carbohidratos identificados fueron: sacarosa, pinitol, glucosa y ononitol. La maltosa y trehalosa están en escasa concentración. El citrato y malonato son los ácidos orgánicos de mayor concentración en sus bacteroides y junto con el malato y succinato constituyen el 85% de la reserva de ácidos orgánicos en nódulos. Entre los aminoácidos presentes en el citosol y bacteroides se encuentran asparagina, glutamato, alanina, γ -aminobutírico y prolina (Fougere *et al.*, 1991). Algunos nódulos de *R. meliloti* producen un compuesto nitrogenado denominado rizopina (3-o-scillo-inosamina) de la que no se conoce su implicación en la fijación de nitrógeno (Murphy *et al.*, 1987).

En general, los nódulos contienen diversos ácidos orgánicos, predominantemente fumarato, malato, succinato, 2-oxoglutarato, citrato, malonato, trans-aconitato y benzoato (Streeter, 1987a; Rosendahl *et al.*, 1990). Hay diferencias significativas en la composición de ácidos orgánicos según la leguminosa y según la cepa bacteriana (Streeter, 1987b; Lafontaine *et al.*, 1989).

Se ha descrito que en bacteroides se acumulan cristales de poli- β -OH-butirato (PHB) que pueden llegar a constituir el 50% del peso seco de las células infectadas de los nódulos (Bergensen y Turner, 1992). Es posible que proporcione de forma adicional y durante cortos periodos de tiempo poder reductor y esqueletos carbonados para fijar nitrógeno y asimilar amonio (Bergensen *et al.*, 1991). Los altos niveles de β -OH-piruvato deshidrogenasa detectados en bacteroides de *Rhizobium tropici* (Romanov *et al.*, 1994) apoyan la doble función que se le asigna al PHB, actuar como reserva del ciclo TCA y suministrar piruvato. Sin embargo, mutantes de *Rhizobium meliloti* incapaces de sintetizar PHB tienen una nodulación y fijación de nitrógeno normal (Povolo *et al.*, 1994)

En bacteroides de alfalfa se han detectado gránulos de almidón en amiloplastos que abundan tanto en células infectadas como no infectadas (Vaughn *et al.*, 1982). Hay pocos estudios sobre el metabolismo del almidón en nódulo, sin embargo debe existir una rápida metabolización del almidón pues se han descrito distintas actividades, α -glucosidasa (Kinnback y Werner, 1992) almidón sintasa, α -amilasa y almidón fosforilasa (Forrest *et al.*, 1991) en nódulos de *Glycine max*.

La prolina también se considera una importante fuente de carbono para bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (Zhu *et al.*, 1992). Sin embargo, el gen que codifica la enzima clave de la síntesis de la prolina se localiza en el citosol de las células infectadas (Szoke *et al.*, 1992) lo que implica el transporte a los bacteroides de los nódulos de soja (Udvardi *et al.*, 1990) y de "cowpea" (Glenn *et al.*, 1991) sin haberse detectado transportador de prolina en la membrana del bacteroide ni en la MPB. Por tanto, la posibilidad de que la prolina sea una fuente de carbono se discute, pudiendo tener un significado importante en condiciones de estrés (Kohl *et al.*, 1994).

La síntesis y acumulación de altas concentraciones de ácido γ -aminobutírico (GABA) en bacteroides de leguminosas (Vance y Heichel, 1991) e incluso formas ligadas de GABA (Butler *et al.*, 1958) han sido motivo de estudio puesto que es un compuesto nitrogenado que no es incorporado fácilmente a las proteínas. El glutamato que se acumula como resultado de la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa puede ser metabolizado vía GABA (Kahn *et al.*, 1985). Mc Dermott *et al.* (1989) sugieren que la síntesis de GABA suministra una ruta alternativa de la síntesis del succinato cuando la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa es inhibida. Concomitantemente con la síntesis de GABA, a expensas de la α descarboxilación del glutamato, es la producción de alanina mediante la alanina aminotransferasa (Vance y Heichel, 1991). Otros autores implican al GABA en la regulación del pH citoplasmático en condiciones

de microaerofilia provocada por la acidosis que condiciona el funcionamiento de la PEPC (Hochachka y Sonero, 1984; Vance y Rustin, 1984).

5.4.2. Procesos oxidativos del nódulo.

El nódulo es un órgano complejo, con una región interna o central y otra externa o córtex que constituye el 35% del volumen nodular (Gordon, 1993). En el córtex es donde se localiza la barrera de la difusión de oxígeno (Witty *et al.*, 1986; James, 1990) y también el sistema vascular donde se descarga la sacarosa al nódulo vía floema. En la región central es donde se localiza prioritariamente el metabolismo carbonado y la síntesis de los productos nitrogenados exportados (Gordon, 1991).

Los estudios comparativos han demostrado que la fracción vegetal de los nódulos tienen más capacidad de asimilar los carbohidratos que los bacteroides (Kouchi *et al.*, 1988; Copeland *et al.*, 1989b). También se ha comprobado que los disacáridos son utilizados por *Rhizobium* spp. pero no por *Bradyrhizobium* spp. puesto que estos carecen de sistema de transporte y de disacaridasas (Glenn y Dilworth, 1981) aún cuando ocasionalmente se han descrito informes distintos (Meyer y Pueppke, 1980). Generalmente las actividades enzimáticas relacionadas con la utilización de carbohidratos son sustancialmente mayores en nódulos que en raíces. En bacteroide no se conoce ningún mecanismo de hidrólisis de la sacarosa y la utilización de la glucosa en los bacteroides está probablemente limitada por la falta de actividad de los enzimas oxidativos (Streeter, 1982; Saroso *et al.*, 1986).

5.4.2.1. Metabolismo enzimático de la sacarosa.

La sacarosa es un disacárido no reductor formado por la unión $\alpha(1-2)-\beta$ de α -D-glucopiranososa y β -D-fructofuranosa. El primer paso para la rotura de la sacarosa es mediante el enlace glicosídico bien por una β -fructofuranosidasa (β -D-fructofuranósido-fructohidrolasa) también llamada **invertasa** (EC 3.2.1.26) o por la **sacarosa sintasa** (UDP-glucosa:D-fructosa 2 α -D glicosiltransferasa, EC 2.4.1.13) (Kruger, 1990). Ambas enzimas, sacarosa sintasa e invertasa alcalina (Fig. 1.4) se localizan en el citosol nodular (Robertson y Taylor, 1973), aunque también se ha detectado una invertasa ácida cuantitativamente poco importante en la rotura de la sacarosa (Robertson y Taylor, 1973; Streeter, 1982).

La sacarosa sintasa es muy abundante en los nódulos de soja constituyendo el 3-4% de la proteína total soluble de la fracción vegetal del nódulo (Morell y Copeland, 1985).

La rotura por la invertasa es irreversible ($\Delta G = -29.3 \text{ kJ mol}^{-1}$) y genera glucosa y fructosa (Copeland, 1990). Esta parece ser la principal enzima involucrada en nódulos inmaduros de soja y su actividad específica se mantiene elevada durante el desarrollo del nódulo, en contraste con la actividad específica de la sacarosa sintasa que es inapreciable en nódulos inmaduros e incrementa con la actividad nitrogenasa (Morell y Copeland, 1984; Anthon y Emerich, 1990). Este aumento de la sacarosa sintasa en el citosol nodular (Gordon *et al*, 1992) puede ser debido a la síntesis de una forma del enzima específica de los nódulos (Thummler y Verma, 1987).

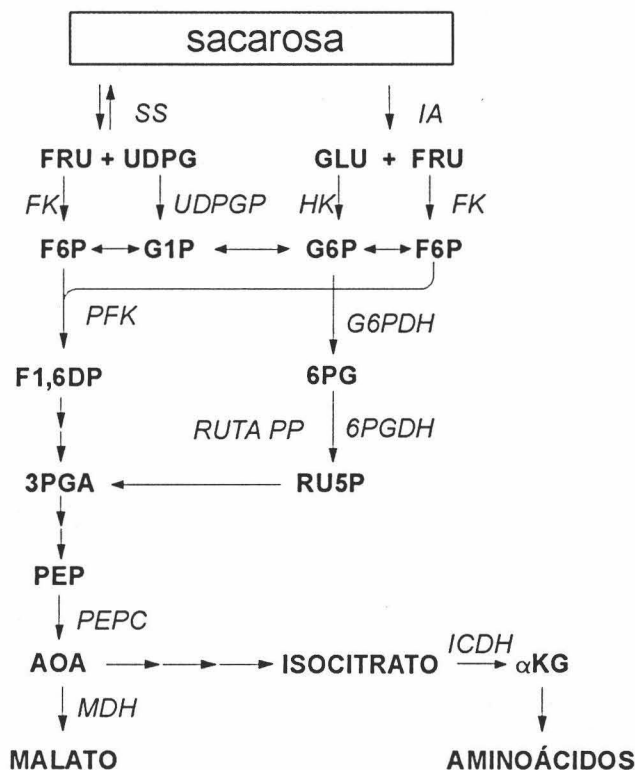


Fig. 1.4. Esquema del metabolismo de la sacarosa en el citosol de nódulos radicales de las leguminosas.

La sacarosa sintasa cataliza la transferencia de un residuo de glucosa al uridindifosfato (UDP) formando UDP-glucosa y fructosa mediante una reacción reversible (Geigenberger y Stitt, 1993). La energía libre de la reacción es $-3,99 \text{ kJ mol}^{-1}$. Se ha discutido el consenso existente del UDP como nucleósido difosfato responsable de la hidrólisis de la sacarosa por la sacarosa sintasa. Pozueta-Romero *et al.* (1991) informa de una sacarosa sintasa específica del ADP. Sin embargo, Ross y Davies (1992) encuentran que la velocidad máxima es cuatro veces más alta con UDP que con ADP.

Cardini *et al.* (1955) describen por primera vez la sacarosa sintasa. Es una enzima citosólica (Keller *et al.*, 1988) y ha sido caracterizada en varias especies vegetales y estudiada en numerosos órganos de plantas tales como raíces (Hole y McKee, 1988; Koch *et al.*, 1992), tubérculos (Geigenberger y Stitt, 1993), cotiledones (Ross y Davies, 1992), hojas (Gupta *et al.*, 1991), frutos (Moriguchi y Yamaki, 1988; Wang *et al.*, 1994b), semillas (Heim *et al.*, 1993) y nódulos radicales de soja (Morell y Copeland, 1985) y habas (Kuster *et al.*, 1993). En nódulos radicales esta enzima puede relacionarse con cuatro funciones (Thummler y Verma, 1987):

- a) Actúa en el paso inicial del metabolismo carbonado produciendo hexosas que por distintas vías oxidativas producen la energía y el poder reductor utilizado por la nitrogenasa.
- b) Los productos de la hidrólisis proporcionan sustratos carbonados que participan en la síntesis de aminoácidos a expensas del amonio excretado por los bacteroides.
- c) La UDP-glucosa puede integrarse en la síntesis de polisacáridos de la pared celular, necesaria en los momentos iniciales de la simbiosis y de otros azúcares nucleótidos.
- d) Este mismo producto de la hidrólisis puede ser convertido en ADP-glucosa necesario para la síntesis del almidón que se almacena en los amiloplastos de las células infectadas y no infectadas.

La sacarosa sintasa es un homotetrámero con un peso molecular nativo en el rango de 280 a 480 kD. Cuando hidroliza su óptimo de actividad se sitúa entre pH 6.0 y 8.5 a 30-35°C. Cuando sintetiza el pH óptimo está entre 8.5-9.5 a 35°C (Claussen, 1983). El valor de K_m difiere según la especie vegetal, encontrándose en un rango de 10 a 290 mM para la sacarosa y 0.05 a 0.6 para el UDP. La fructosa y la glucosa

actúan como inhibidores no competitivos (Sebková *et al*, 1995).

Algunos estudios han demostrado la existencia de múltiples formas de sacarosa sintasa (Gross y Pharr, 1988; Nguyen-Quoc *et al*, 1990; Buczynski *et al*, 1993). Así, han sido caracterizadas en endospermo de maíz dos isoenzimas (SS1 y SS2) codificadas por dos genes con expresión diferencial (Chourey *et al*, 1986; Nguyen-Quoc *et al*, 1995). En contraste solo un gen codifica esta enzima en algunas dicotiledóneas como tomate (Wang *et al*, 1993) judía (Arai *et al*, 1992), zanahoria (Sebková *et al*, 1995) y en cotiledones de haba (Heim *et al*, 1993).

En nódulos de soja, los monómeros de esta enzima son idénticos a la nodulina tardía Ngm-100 (Thummler y Verma, 1987). La abundancia de esta actividad enzimática en nódulo es 70 y 20 veces mayor que en hojas y raíz respectivamente (Fuller y Verma, 1984). También la sacarosa sintasa de nódulos de *Vicia faba* ha sido aislada y secuenciada, identificándose con una nodulina que Küster *et al*. (1993) proponen designarla como VnNOD93 (Nnf-93). El gen que codifica esta nodulina es fuertemente expresado en nódulos, siendo 10 veces menor su expresión en raíces, hipocótilos, tallos y flores e inapreciable su expresión en hojas. Además no se transcribe en semillas maduras de *Vicia faba*.

La invertasa alcalina ha sido parcialmente purificada de nódulos de soja (Morell y Copeland, 1984). Tiene un pH óptimo de 7.6 y la K_m para la sacarosa es de 10 mM. La fructosa es un inhibidor competitivo de esta enzima y es muy sensible a los metales pesados.

Ni la invertasa alcalina ni la sacarosa sintasa están sujetas a un fino mecanismo de control. Probablemente ambas actividades están reguladas por la disponibilidad de sacarosa en el citosol o simplemente en base a sus diferentes afinidades por el sustrato. El valor de K_m para la sacarosa en nódulos de soja de la invertasa alcalina y de la sacarosa sintasa son 10 y 30 mM respectivamente (Morell y Copeland, 1984).

Las actividades SS e IA pueden ser seriamente afectadas por las concentraciones de hexosas "in vivo". Esto implica que la glucosa puede tener un papel regulador y, puesto que la IA es la única enzima productora de glucosa, puede estar implicada en la regulación de estas actividades enzimáticas. Igualmente importantes son las actividades hexoquinasa y fructoquinasa, pues en conjunción con la SS y la IA determinan los niveles de hexosas libres (Gordon, 1995)

La actividad de la invertasa alcalina es mayor al principio del fotoperiodo y

mínima al principio de la oscuridad. Estos hechos hacen suponer que el transporte de sacarosa al nódulo puede modular la actividad de la invertasa alcalina y la degradación de la sacarosa (Henson *et al.*, 1984). Se ha descrito que la actividad invertasa de los nódulos se desarrolla antes que la puesta en marcha de la fijación de nitrógeno, mientras que la sacarosa sintasa lo hace en las fases posteriores del desarrollo del nódulo (Emerich *et al.*, 1988).

La glucosa y fructosa producida por la hidrólisis de la sacarosa son fosforiladas para formar las correspondientes hexosas-6-P por quinasas específicas (Copeland y Turner, 1987) la hexoquinasa y fructoquinasa respectivamente. La fructoquinasa es más abundante en el citosol, mientras que la hexoquinasa lo es en el bacteroide (Morell y Copeland, 1984). La glucosa-1P es transformada en glucosa-6P y posteriormente en fructosa-6P por acción de una fosfoglucomutasa y fosfohexosa isomerasa respectivamente. Estos enzimas son muy activos en la fracción vegetal de nódulos de soja (Copeland *et al.*, 1989b).

5.4.2.2. Metabolismo de la glucosa.

El primer paso en la incorporación de la fructosa-6P en la vía glucolítica es la fosforilación para formar fructosa-1,6 difosfato. Los tejidos vegetales tienen dos enzimas capaces de catalizar este paso denominadas fosfofructoquinasa (PFK) y fosfofructofosfotransferasa (PFP). La primera de ellas cataliza una reacción irreversible en el citoplasma y plastidios. La segunda es una enzima citoplásmica que utiliza pirofosfato (PPi) en una reacción reversible. Como metabolito regulador de la enzima actúa la fructosa 2,6 difosfato que es un potente activador de esta, pero el significado metabólico de esta enzima no está clarificado (Stitt, 1990). En nódulo de soja PFK puede ser más importante que PFP en la conversión de la fructosa-6P en fructosa 1,6 difosfato. El potencial catalítico de PFK en el citosol nodular es mayor que el de PFP (Salminen y Streeter, 1987b). La actividad de la PFK citosólica es fuertemente inhibida por concentraciones micromolares de fosfoenolpiruvato (PEP), 3-fosfoglicerato y 2-fosfoglicerato y mitigada por el Pi (Vella, 1990).

La conversión de fructosa 1,6 difosfato a fosfoenolpiruvato se realiza por la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) cuyos enzimas se localizan en el citosol vegetal del nódulo (Kouchi *et al.*, 1988).

El producto final de la vía glucolítica, oxalacetato o pirúvico, viene determinado por la actividad relativa de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) o

piruvato quinasa. En nódulos de leguminosas la producción de oxalacetato está probablemente favorecida. El potencial catalítico de la PEPC en la fracción vegetal del nódulo excede a la piruvato quinasa y es muy superior al de la raíz (Copeland *et al.*, 1989b). Ambas enzimas nodulares presentan valores de K_m para el PEP comparables (Vance y Stade, 1984) mientras que en otros tejidos vegetales la afinidad de la PEPC por el PEP es usualmente un orden de magnitud menor que la piruvato quinasa (O'Leary, 1982).

La vía glucolítica tiene como punto final la formación de acetil-CoA y su oxidación en la mitocondria a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Sin embargo, el número de mitocondrias es muy escaso en comparación con los bacteroides en las células infectadas (Werner y Krotzky, 1983) y aunque la relación ADP/O detectada es la usual para mitocondrias activas y aerobias (Rawsthorne y LaRue, 1985), existen serias dudas de que la producción de ácidos orgánicos sea suficiente para satisfacer los requerimientos de bacteroide (Day y Mannix, 1988).

5.4.2.3. Vía de las pentosas fosfato (PPP).

La ruta de las pentosas fosfato se inicia con dos reacciones de oxidación catalizadas por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) y la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42). Ambas fueron descritas por primera vez por Ronson y Primrose (1976) y posteriormente los demás enzimas de la ruta fueron establecidos por Saroso *et al.*, (1986) y Mc Kay *et al.*, (1989).

La glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) ha sido purificada del citosol vegetal en nódulos de soja (Hong y Copeland, 1991). Se detectan dos isoenzimas con una regulación que puede ser importante en el control de la vía de las pentosas fosfato. La 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) también ha sido caracterizada en el mismo material simbiótico (Hong y Copeland, 1992) detectando dos isoenzimas específicas por el $NADP^+$. Presentan un máximo de actividad a pH 8.6 y 8.9 respectivamente. Son muy lábiles en ausencia de 2 mercaptoetanol, requieren para su estabilidad adición de glicerol y fosfato y 2 mercaptoetanol. El peso molecular del enzima nativo es de 110.000 daltons. La enzima tiene una afinidad similar por la forma reducida y oxidada de piridín nucleótido, por tanto la relación $NADPH^+/NADP^+$ debe ser importante en la regulación enzimática. Como $NADPH^+$ es un potente inhibidor de la G6PDH (Hong y Copeland, 1991) es probable que exista un control coordinado en los dos primeros pasos de la vía de las pentosas fosfato.

Se considera como ruta alternativa de la rotura de carbohidratos la vía de las pentosas-fosfato que funciona generando NADPH utilizado en reacciones biosintéticas (Anthon y Emerich, 1990) y precursores biosintéticos como ribosa-5P y eritrosa-4P (Copeland y Turner, 1987). El catabolismo de las pentosas lo relacionan otros autores con la formación de ácidos aromáticos y metabolitos secundarios (Dilworth *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989).

Utilizando nódulos de *Lupinus* se comprobó que esta vía contribuye escasamente a la oxidación de la glucosa (Laing *et al.*, 1979). Sin embargo, cuando Hong y Copeland (1990) estudiaron la localización subcelular de las enzimas relacionadas con la vía de las PP en nódulos de *Glycine max* demostraron que están asociadas a los plastidios y a la fracción soluble del nódulo y que la actividad específica de las enzimas implicadas incrementa con el desarrollo del nódulo. En un estudio comparativo de la utilización de esta vía oxidativa por leguminosas transportadoras de ureidos y de aminas se comprobó que la actividad específica de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato es mayor en nódulos exportadores de ureidos (Hong y Copeland, 1990).

Los *Rhizobium* en vida libre de crecimiento rápido como *R. leguminosarum* poseen la ruta oxidativa de las pentosas-fosfato de la que carecen los de crecimiento lento como *Bradyrhizobium japonicum*. La evidencia de la vía de las pentosas-fosfato se ha basado habitualmente en la presencia de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Sin embargo, la presencia de la primera enzima de la vía no es una prueba inequívoca de que el ciclo completo está presente. Mc Kay *et al.* (1989) han demostrado la existencia de todas las enzimas de esta ruta en *R. leguminosarum* MNF300. Por el contrario, los bacteroides tienen limitada su capacidad de utilizar los carbohidratos (Copeland *et al.*, 1989). Excepcionalmente se han encontrado algunos enzimas de la vía de las PP en bacteroides de *R. leguminosarum*. Sin embargo, no se han encontrado estas enzimas en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* (Saroso *et al.*, 1984)

5.4.2.4. Producción de ácidos dicarboxílicos.

Las condiciones microaeróbicas (10 nM O₂) existentes tanto en la célula huésped como en el simbiosoma puede afectar a los ciclos oxidativos mitocondriales y citoplásmicos. En respuesta a las condiciones de microaerofilia las plantas responden aumentando la actividad de dos enzimas: fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato

deshidrogenasa. Ambas enzimas están incrementadas en nódulos respecto a la raíz entre 5 a 50 veces en *Vicia faba* y *Glycine max* (Lawrie y Wheeler, 1975; Waters *et al.*, 1985; Kouchi *et al.*, 1988). La producción de ácidos orgánicos para los bacteroides está asegurada por la actividad conjunta de estas dos enzimas fundamentales del metabolismo carbonado nodular.

A) Fosfoenolpiruvato carboxilasa

Se considera que esta enzima está involucrada en distintos aspectos de la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas, entre los que se incluyen: **a)** Síntesis de ácidos orgánicos, málico y succínico, utilizados como sustrato respiratorio de los bacteroides (Rosendahl *et al.*, 1990) para la actividad nitrogenasa. **b)** Suministro de esqueletos carbonados para la asimilación del amonio. El oxalacetato es básico para formar aspartato y asparagina en nódulos productores de aminas (Christeller *et al.*, 1977). Se ha descrito que en nódulos de alfalfa esta vía metabólica suministra el 25% del carbono necesario para la asimilación del amonio (Vance *et al.*, 1983). **c)** Los ácidos orgánicos producidos pueden mantener el balance intracelular de pH y equilibrar el transporte de iones (Israel y Jackson, 1982). **d)** Recicla el CO₂ procedente de la respiración, contribuyendo a la economía del carbono en los nódulos (Deroche y Carrayol, 1988). Se estima que el 32% del carbono respirado es reasimilado en los nódulos por esta vía (Rainbird *et al.*, 1984). Esta reacción anaplerótica puede significar una reducción del coste energético de la fijación de nitrógeno (Coker y Schubert, 1981).

Esta enzima, descubierta en vegetales (Bandursky y Greyner, 1953) y ausente en sistemas animales, cataliza un proceso irreversible de carboxilación de PEP para producir ácido oxalacético y fósforo inorgánico, altamente exergónico, dependiente de Mg⁺⁺. Se localiza en el citoplasma celular y es muy abundante en el tejido nodular (Maxwell *et al.*, 1984).

El enzima ha sido parcialmente purificado de nódulos de judía (Deroche *et al.*, 1983) soja (Schuller *et al.*, 1990) altramuz (Marczewski, 1989; Christeller *et al.*, 1977) y alfalfa (Vance y Stade, 1984). El peso molecular nativo del enzima es de 440 kDa, es un homotetrámero y cada subunidad oscila entre 100 kDa (Schuller *et al.*, 1990) y 120 kD (Hofner *et al.*, 1989). Este activo tetrámero se disocia en monómeros en presencia de urea (Wedding *et al.*, 1992). Numerosos investigadores han detectado la existencia de formas oligoméricas de esta enzima (Jawali, 1990; Willeford *et al.*,

1990). La forma tetrámera del enzima se demuestra que es la más activa (Podesta *et al.*, 1990).

En nódulos de judía se han separado dos isoformas de PEPC (Deroche *et al.*, 1983). Solo una forma del enzima ha sido purificada en nódulos de soja (Peterson y Evans, 1979) y de alfalfa (Vance y Stade, 1984) aunque se ha detectado, en el revelado de la cromatografía por SDS-PAGE cinco y dos bandas respectivamente. En nódulos de altramuza se han separado dos formas PEPC-I y PEPC-II y otra forma de la enzima en raíz PEPC-III. Del estudio comparativo de las propiedades cinéticas y bioquímicas de la enzima se deduce que la PEPC-I está estrechamente relacionada con la fijación de nitrógeno (Marczewski, 1989) pudiéndose considerar como una nodulina (Miller *et al.*, 1987).

Los estudios inmunológicos han demostrado que los antisueros preparados de PEPC de hojas de maíz reconocen a la PEPC de distintos nódulos de leguminosas. Sin embargo el antisuero preparado de PEPC de nódulos de alfalfa reconoce a la PEPC de plantas C₄ pero no de plantas C₃ (Miller *et al.*, 1987). Por tanto hay una isoforma de PEPC nodular que muestra homología con una isoforma de PEPC de plantas C₄. La composición de aminoácidos de la PEPC procedente de C₄ monocotiledóneas y dicotiledóneas y de *E. coli* son semejantes (Fujikura y Sun, 1991).

Los inhibidores de esta enzima son aspartato, malato, glucosa, piruvato y 2-oxoglutarato (Marczewski, 1989). Como activadores actúan la glucosa-6-P y la glicina (Andreo *et al.*, 1987). El pH influye en la inhibición por el malato y aspartato. Generalmente el pH intracelular está en torno a 7.0 y a pH 7.2 la enzima es fuertemente inhibida por el malato y aspartato (Peterson y Evans, 1979). Esto puede reflejar la influencia de estos compuestos en la regulación de la actividad enzimática *in vivo*. Davies (1979) sugiere que las actividades combinadas del PEPC y MDH pueden funcionar como un sistema para regular el pH intracelular. En nódulos de soja el pH y la presencia de glicerol modifican el comportamiento de los tres grupos de inhibidores de la enzima que Schuller *et al.*, (1990) proponen. En el primer grupo entrarían malato, aspartato, glucosa y oxoglutarato, en el segundo el citrato y en el tercer grupo se incluiría 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato y fósforo inorgánico (Pi). La enzima puede ser inactivada reversiblemente por concentraciones micromolares de tetranitrometano, lo que indica que los residuos de tirosina son esenciales para la actividad (Maralihelli y Bhagwat, 1992). Previamente Christeller *et al.* (1977) habían listado como inhibidores del enzima a glicerato, malato, fosfoglicerato, isocitrato, aspartato y ATP. De la misma forma se comporta la enzima procedente de otros

órganos vegetales (Wedding *et al.*, 1990).

El sitio activo de la enzima ha sido estudiado utilizando inhibidores competitivos que exhiben alguna analogía con el sustrato (O'Leary, 1982). De estos estudios se deduce la importancia del grupo fosfato y carboxilo, la disposición especial de los enlaces C-O-P (Andreo *et al.* 1987) y la presencia de restos histidina, arginina, cisteína y lisina, como esenciales para la actividad catalítica involucrados en la unión al sustrato. La regulación de la actividad catalítica está acompañada por cambios en el estado de agregación de la enzima (Wu *et al.* 1990; Podestá *et al.* 1990).

El mecanismo de regulación de la PEPC ha sido ampliamente estudiado en plantas C₄ y CAM debido a su importancia fisiológica. Concretamente en hojas de maíz la fosforilación de la PEPC mediante una proteína-quinasa endógena (Budde y Chollet, 1986) provoca una inactivación parcial de la enzima, incrementa la sensibilidad a su inhibición alostérica por el malato y anula la actividad catalítica a niveles subóptimos de PEP y pH (Jiao *et al.*, 1991) aun cuando no afecta a la velocidad máxima de la enzima (Wu y Wedding, 1992). Este proceso de fosforilación/defosforilación probablemente sea el responsable de los cambios de las propiedades enzimáticas observadas en luz-oscuridad (Jiao y Chollet, 1989). Por tanto, en plantas C₄ esta quinasa estaría activada reversiblemente por la luz y en plantas CAM por los ritmos circadianos (Nimmo, 1993; Lepiniec *et al.*, 1994). Concretamente Jiao y Chollet (1990) identifican el residuo regulador específico de la serina que se fosforila y que induce los cambios en las propiedades catalíticas y reguladoras de la enzima mencionados.

En contraste poco se conoce sobre la regulación postranslacional en el enzima de las C₃ aunque también está sujeto a un control alostérico (Wang *et al.* 1994). Hay trabajos realizados en hojas de tabaco (Wang y Chollet 1993) y con células estomáticas de *Vicia faba* (Zhang *et al.* 1994) que sugieren cambios en su aparente estado de fosforilación, mediante una quinasa que ha sido parcialmente purificada y caracterizada (Li y Chollet, 1994).

En nódulos escindidos de soja, se ha descrito una PEPC poco activa que se induce por las condiciones de falta de fotosintato y se transforma en forma activa por la incubación con ATP. Esta conversión es revertida por la acción de una fosfatasa alcalina (Winter y Schuller, 1995). Estos datos indican dos estados de fosforilación diferentes de la enzima. Chollet *et al.* (1995) suministran evidencias inequívocas que la PEPC nodular de *Glycine max* está sujeta *in vivo* a un ciclo regulador seril-

fosforilación/seril-desfosforilación, como el ya establecido en isoformas fotosintéticas en C₄ y CAM (Nimmo, 1993; Lepiniec *et al.*, 1994). Estos estados de fosforilación de la enzima nodular son probablemente modulados por el suministro de fotosintato de las hojas (Zhang *et al.*, 1995b). Estos datos son significativos porque tienen importantes implicaciones en la interacción del metabolismo citosólico del carbono y nitrógeno en nódulos, en virtud del suministro de esqueletos carbonados para la asimilación de nitrógeno en aminoácidos. Se ha demostrado que la PEPC está positivamente correlacionada con la actividad reductora de acetileno (ARA) (Vance *et al.*, 1985; Lang y Golvano, 1988). Sin embargo, Rosendhal y Jakobsen (1987) no lo relacionan con la nitrogenasa sino con la acumulación de nitrógeno total en la planta huésped.

B) Malato deshidrogenasa

Tradicionalmente se ha considerado que la glucólisis finaliza con el piruvato que es importado a la mitocondria, convertido en acetil-CoA que inicia el ciclo de Krebs, en la condensación con el oxalacetato. Sin embargo, en plantas Lance y Rustin (1984) proponen que el malato puede constituir el producto final de la glucólisis por varias razones:

- a) las células vegetales tienen grandes vacuolas donde se almacena el malato.
- b) La PEPC es una enzima universal en el citosol celular.
- c) El malato puede ser oxidado por dos enzimas: MDH y la enzima málico (EM) que actúa como descarboxilasa oxidativa.
- d) En mitocondrias vegetales el piruvato es difícilmente oxidado.

Se considera que el malato es un metabolito mayoritario en el metabolismo vegetal y en el nódulo de leguminosas en particular (Vance y Herchel, 1991) y representa un potencial de adaptación en condiciones de microaerobiosis (Davies, 1980; LaRue *et al.*, 1984). Se ha confirmado en los nódulos la presencia de tres formas de malato deshidrogenasa: **citosólica** (Henson y Collins, 1984) **bacteroidal** y **mitocondrial** (Glenn *et al.*, 1984; Waters *et al.*, 1985). La MDH mitocondrial funciona en la dirección de la oxidación de malato, síntesis de AOA y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Bowman y Ikuma, 1976). Esta MDH mitocondrial ha sido aislada y purificada en distintas especies vegetales (Gietl *et al.*, 1990; Unger *et al.*, 1989; Hayes *et al.*, 1991).

La MDH citoplásmica reduce el AOA procedente de la fijación de CO₂ por la PEPC (Duke y Henson, 1985). Esta reacción citoplásmica mantiene los requerimientos de equivalentes de reducción (piridín nucleótidos) con la gliceraldehído-3P deshidrogenasa. En nódulos de soja, la enzima citoplásmica es muy sensible a su inhibición por el NADH (Copeland y Zammit, 1990). Cuando la concentración de malato es muy elevada (3-7 mM) se forma un complejo malato deshidrogenasa /NADH-malato para evitar que la concentración de AOA disminuya a un nivel que no pueda ocurrir la síntesis de aspartato por una aminotransferasa (AAT) (Copeland *et al.*, 1989). Esta reacción es más importante en leguminosas transportadoras de aminas que en las que transportan ureidos. Ambas enzimas, MDH y AAT son activas en la fracción vegetal de los nódulos (Egli *et al.*, 1989). También se ha indicado en el citosol nodular la presencia de la EM-NADP⁺ que reduce los niveles de malato del nódulo por descarboxilación a piruvato (Lawrie y Wheeler, 1975). La afinidad de esta enzima por el piruvato es varias veces menor que por el malato. Junto a MDH y PEPC esta enzima puede actuar controlando cambios de pH en los tejidos del nódulo.

El málico y el succinato son considerados substratos idóneos para suministrar la energía a la nitrogenasa del bacteroide. La transformación en acetyl-CoA y AOA que operan en el ciclo de Krebs se realiza mediante la EM y la MDH, ambas activas en bacteroides (Driscoll *et al.*, 1990; Delgado *et al.*, 1993). La EM ha sido estudiada por Emerich *et al.* (1988) habiéndose detectado dos EM que dependen del NAD⁺ y otra del NADP⁺ (Quinnell *et al.*, 1990). La EM-NAD⁺ tiene una K_m muy alta para el malato, su contribución a la producción de ATP para la nitrogenasa debe ser importante (Copeland *et al.*, 1989a). La EM-NADP⁺ es constitutiva y debe estar implicada en el suministro de poder reductor a la nitrogenasa (Day y Copeland, 1990).

C) Isocitrato deshidrogenasa

La isocitrato deshidrogenasa (ICDH) cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α -cetoglutarato, reacción acoplada a la reducción de un piridín nucleótido; este α -cetoglutarato puede funcionar como metabolito de unión entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Chen *et al.*, 1988). Se han descrito dos enzimas con actividad ICDH, que muestran una gran especificidad en su aceptor de electrones, NAD⁺-ICDH e NADP⁺-ICDH con marcadas diferencias en su función catalítica y en sus propiedades fisiológicas (Chen y Gadal, 1990).

Se han detectado ambas enzimas en procariontas y en diferentes comparti-

mentos celulares de eucariotas. La enzima dependiente de NAD (NAD⁺-ICDH, EC 1.1.1.41) se considera de localización exclusiva mitocondrial donde tiene una función importante en el ciclo de Krebs. Sin embargo, NADP⁺-ICDH (EC 1.1.1.42) se localiza en distintos compartimentos celulares como cloroplastos (Chen *et al.*, 1989), citosol (Illingworth y Tipton, 1970) mitocondria (Huh *et al.*, 1993; Cornu *et al.*, 1996) y peroxisoma (Yamazaki y Tolbert, 1970).

La NADP⁺-ICDH ha sido estudiada en plántulas etioladas (Omran y Dennis, 1971) en hojas (Randall y Givan, 1981) en semillas maduras (Curry y Ting, 1976), en la germinación (Satoh, 1972; Nieri *et al.*, 1995), en nódulos de leguminosas (Henson *et al.*, 1986) y en extractos de bacteroides de *Pisum sativum* (Kurz y LaRue, 1977) y *Lupinus* (Robertson y Taylor, 1973).

La NADP⁺-ICDH de *Azotobacter vinelandii* ha sido descrita como muy activa (Barrera y Jurtshuk, 1970) e incluso su ausencia se relaciona con la incapacidad de fijar nitrógeno (Kurz y LaRue, 1973). En *Clamidomonas reinhardtii*, han sido descritas ambas formas de ICDH, dependiente del NAD⁺ y del NADP⁺ (Martínez-Rivas y Vega, 1963).

En dicotiledóneas NADP⁺-ICDH se han descrito principalmente en especies de las tribus *Viciae* y *Trifoliae* de la familia de las Fabáceas como *Pisum sativum* (Chen *et al.*, 1989) *Cicer arietinum* (Gupta y Singh, 1988) y *Medicago sativa* (Henson *et al.*, 1986) entre otras especies.

El enzima requiere iones divalentes como Mn⁺⁺ o Mg⁺⁺ (Udvardi *et al.*, 1993); es estable a pH 7-8. Sin embargo el óptimo para la reacción directa e inversa resultó ser 8.4 y 6.0 respectivamente (Omran y Dennis, 1971). Es inhibida por el ácido glioxílico y el ácido oxalacético, así como por los productos de reacción, el NADPH/NADH y el α -cetoglutarato. Gupta y Singh (1988) postulan que la actividad del NADP⁺-ICDH está controlada por el nivel intracelular de la relación NADPH/NADP⁺. El citrato es un inhibidor competitivo de la actividad de esta enzima (Henson *et al.*, 1986). La inactivación de la NADP⁺-ICDH por fosforilación se piensa que es debida a la disminución de la unión al cofactor NADP⁺ (Thorsness y Koshland, 1987).

La isocitrato deshidrogenasa dependiente del NADP⁺ puede tener especial importancia en nódulos de leguminosas transportadoras de aminas y amidas, ya que pueden suministrar el sustrato carbonado (α -cetoglutarato) necesario para asimilar el amonio procedente de la fijación de nitrógeno, mediante el ciclo de la glutamina

sintetasa (GS/GOGAT-NADH) (Hanning y Heldt, 1993). Además, también se ha sugerido otra función clave relacionada con el suministro de poder reductor en el citosol, especialmente durante el funcionamiento del ciclo de las pentosas fosfato (Omran y Dennis, 1971).

5.4.2.5. Vías fermentativas: Anaerobiosis.

El interior del nódulo es esencialmente microaerobio, condicionado por la pequeña concentración de oxígeno libre que es mantenida en el citoplasma por la leghemoglobina (Appleby, 1984). En estas condiciones parte del piruvato generado en la glucólisis no entra en el ciclo de Krebs, pudiendo ser metabolizado por la vía fermentativa (Duke y Henson, 1985) aunque es discutido que el proceso fermentativo se estimule debido a la naturaleza microaeróbica del nódulo (Smith, 1985). Cuando las raíces se someten a un estrés de oxígeno, determinadas actividades enzimáticas como PEPC, malato deshidrogenasa (MDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH) se expresan con la misma intensidad, lo que indica que los tejidos nodulares se comportan como raíces o plantas tolerantes al encharcamiento (De Vries *et al.*, 1980).

Las rutas fermentativas detectadas en los nódulos son: **a)** Producción de lactato, mediante la lactato deshidrogenasa (Lang y Golvano, 1988); **b)** Producción de acetaldehído y etanol mediante la piruvato descarboxilasa, cuya actividad se desarrolla paralela a la actividad nitrogenasa localizada en el citosol nodular, la alcohol deshidrogenasa detectada tanto en citosol como en bacteroide (Tajima y Larue, 1982; Sukanuma y Yamamoto, 1987), y la aldehído deshidrogenasa detectada también en bacteroides. Grovers *et al.* (1986) estudiando la microaerobiosis en nódulos de *Pisum sativum* concluyeron que la expresión de enzimas como la ADH no responden a microaerobiosis reforzando la idea de que el O₂ del nódulo es bajo pero se mantiene por encima del umbral de anaerobiosis. La ADH fue más activa en nódulos inefectivos según un trabajo realizado por Anthon y Emerich (1990) en nódulos de *Glycine max* con distintos grados de efectividad. Los nódulos inefectivos puesto que carecen de leghemoglobina podrían ser menos anaeróbicos, lo que inducía a pensar que el oxígeno es el responsable de este comportamiento. Sin embargo, se ha descrito que la ADH se induce en tejidos en anaerobiosis (Waller *et al.*, 1987), además la expresión de la enzima se observa en raíces privadas de oxígeno (Grovers *et al.*, 1986) y se estimula en condiciones de encharcamiento (Anthon y Emerich, 1990). Todo ello indica que durante la nodulación la enzima está regulada por otro mecanismo distinto al de la anaerobiosis.

6. Interacción del nitrógeno combinado con el proceso de fijación de nitrógeno.

El nitrato es la forma predominante de nitrógeno combinado asimilable para las plantas y en las leguminosas puede influir tanto en la fijación de nitrógeno como en la nodulación. Desde el punto de vista energético la planta prefiere reducir el nitrato que mantener la fijación biológica (O'Brian y Mayer, 1989) puesto que el coste biológico en términos energéticos y de requerimiento de carbono para la absorción y asimilación de nitrato es aproximadamente una tercera parte menor que el costo de la fijación de nitrógeno (Pate y Layzell, 1990). Dependiendo del órgano en que se reduzca o se asimile el nitrato, se ha estimado que es 4-8 veces más eficiente para una planta asimilar nitrato que fijar nitrógeno atmosférico (Postgate, 1982). Además, la asimilación del nitrato se realiza en la raíz y/o en la parte aérea de la planta, mientras que la fijación de nitrógeno simbiótica requiere de órganos especializados (Bergensen, 1982).

6.1. Efecto del nitrato: concentración.

La concentración de nitrógeno combinado determina si su disponibilidad es estimulante o perjudicial para la fijación de nitrógeno. Así, durante el desarrollo del nódulo y antes de iniciarse el proceso de fijación simbiótica, el nitrógeno puede llegar a ser limitante en plántulas de leguminosas, que solo disponen del nitrógeno procedente de los cotiledones (Sánchez-Guerrero Cantó, 1996) y del nitrógeno del suelo. Si la cantidad de nitrógeno es muy restrictiva, las leguminosas experimentan, después de agotarse las reservas de las semillas, un periodo de "hambre de nitrógeno" (Pate y Layzell, 1990) que retarda su desarrollo y puede reducir la cosecha. Después del inicio de la fijación, los órganos simbióticos de las leguminosas son parcialmente autosuficientes en nitrógeno, alcanzando una concentración entre 6-8% de nitrógeno, muy elevada si se compara con otros órganos de la planta como las raíces que oscilan entre 1.5-2%. Este alto costo del desarrollo del nódulo implica que ante un agotamiento del nitrógeno, se reduce la acumulación de biomasa, se afecta la disponibilidad de carbono a los nódulos y se retrasa el desarrollo de los mismos (Hansen, 1994). Por tanto, moderadas dosis de nitrógeno mineral al inicio del cultivo, son beneficiosas para el crecimiento de la plántula y subsecuentemente para la fijación de nitrógeno (Goi *et al.*, 1993).

En leguminosas grano también se requiere nitrógeno durante el llenado de la vaina, debido al intenso transporte de nitrógeno desde los órganos vegetativos a los

reproductores (Silva *et al.*, 1993). Estudios realizados en soja demostraron que este transporte es tan elevado que afecta al proceso fotosintético (Dunply y Hanway, 1976). Este suministro de nitrógeno puede evitar la temprana senescencia de las hojas (Frith y Dalling, 1986) sin inhibir la fijación de nitrógeno (Afza *et al.*, 1987).

Los informes de Raggio y Raggio (1962) ya indicaban que el nitrato inhibía la fijación biológica de nitrógeno a altas concentraciones (10 mM) y se estimulaba a concentraciones de 1 mM o más bajas. Esto contrasta con el artículo de Streeter (1988) que indica que el proceso de infección no se afecta a bajas concentraciones de nitrógeno combinado y se inhibe si se excede de 5 mM. Los estudios de Munns (1977) apuntan concentraciones más bajas que las anteriormente comentadas. El tema se complica si se consideran diferentes formas de nitrógeno combinado. En general, el nitrato afecta más al proceso que el amonio (Atwell, 1992) mientras que el efecto de la urea fue escaso (Goi *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1993).

También es interesante señalar que la repuesta a una concentración de nitrato viene condicionada por el genotipo de la planta (Caba *et al.*, 1991; Cherney y Duxbury, 1994), por la forma de aplicación de nitrato (Tanacka *et al.*, 1985), por la etapa de crecimiento en que se suministra el nitrato (Truchet y Dazzo, 1982), por el tiempo de exposición al nitrato, por la especie de leguminosa (Sagan *et al.*, 1993), por estrés ambiental como déficit hídrico (Sánchez Díaz, 19--) y salinidad (Cordovilla *et al.*, 1996) entre otros factores. De hecho, 20 mM de nitrato inhibe la nodulación en haba y guisante (Díaz, 1989) y 16 mM en trébol (Dazzo y Brutt, 1978).

6.2. Procesos que se afectan con el nitrato.

El nitrato afecta a diferentes eventos del proceso simbiótico: **a)** reduce el crecimiento de los pelos radicales necesario para la infección (Truchet y Dazzo, 1982) **b)** disminuye la síntesis de lectinas necesarias para la unión del *Rhizobium* a la superficie radical (Sherwood *et al.*, 1984) **c)** el desarrollo del nódulo (Harper, 1987) **d)** inhibe la actividad nitrogenasa específica (Waterer y Vessey, 1993) **e)** reduce la producción de flavonoides e isoflavonoides en la raíz y su subsecuente liberación al suelo (Wojtassek *et al.*, 1992; Coronado *et al.*, 1995) **f)** modifica la respuesta quimiotáctica de *Rhizobium* a la leguminosa (Dusha *et al.*, 1989) **g)** afecta directamente los genes *nod* en el *Rhizobium* que inducen la iniciación del primordio nodular (Verma, 1992) **h)** reduce el crecimiento del nódulo (Kage, 1995) **i)** disminuye el suministro de energía a los bacteroides (Serraj *et al.*, 1992) **j)** afecta la funcionalidad

del nódulo (Minchin *et al.*, 1989; Walsh y Carroll, 1992) **k**) altera el balance de las fitohormonas nodulares (Ligero *et al.*, 1995) **l**) induce la senescencia en el nódulo (Pladys *et al.*, 1988) **m**) degrada la leghemoglobina (Becana y Sprent, 1989) **n**) promueve la formación de radicales libres inductores de la senescencia (de Lorenzo *et al.*, 1994) **o**) afecta al metabolismo del nitrato (Caba *et al.*, 1995) y del amonio en el nódulo (Cordovilla *et al.*, 1996), entre otros efectos.

6.3. Mecanismos de inhibición del nitrato.

La hipótesis más primitiva está basada en la limitación de fotoasimilados a los nódulos como resultado de los requerimientos energéticos para la reducción de nitratos (Oghoghorie y Pate, 1971). Sin embargo, aunque la presencia de algunos carbohidratos puede disminuir el efecto inhibitorio del nitrato (Stephen y Neyra, 1983), la concentración de fotoasimilados disminuye con el nivel de nitrato (Streeter, 1986).

Otra hipótesis relaciona la inhibición de la nitrogenasa por los nitratos a través de los productos finales y las enzimas involucradas en la asimilación de amonio procedente de la fijación ya que ambos son semejantes a los que operan en tallos y raíces tras la asimilación del nitrato (Shanmugam *et al.*, 1978).

También es clásica la hipótesis que relaciona al nitrito, potencial inhibidor de la nitrogenasa, como causa de la inhibición de la fijación de nitrógeno por el nitrato. Ello implicaría que los nódulos deben captar y asimilar el nitrato. De hecho, la actividad nitrato reductasa (NRA) ha sido detectada en el citosol de nódulos (Caba *et al.*, 1995) y en bacteroides de algunos sistemas simbióticos (Becana y Bedmar, 1990). Sin embargo, mutantes de *Rhizobium* deficientes en NRA muestran inhibición por el sustrato (Streeter, 1988). Hay estudios que indican que la acumulación de nitritos en el nódulo induce la inhibición enzimática y la senescencia nodular (Becana *et al.*, 1985; Wasif y Prioul, 1986) aunque todavía se discute si el nitrato del suelo penetra en el nódulo (Sprent *et al.*, 1987).

Como alternativa al modo de acción del nitrato se han propuesto otras dos hipótesis, ambas relacionadas con la disminución del suministro de oxígeno respiratorio en el nódulo (Hunt y Layzell, 1993). La primera de ellas (Minchin *et al.*, 1989) propone que el nitrato incrementa la resistencia a la difusión del oxígeno, afectando la permeabilidad en el córtex nodular. La barrera a la difusión del oxígeno ha sido identificada por Janetta *et al.* (1993) en nódulos de *Glycine max* y de Lorenzo *et al.* (1993) en nódulos de *Lupinus albus*, aun cuando el mecanismo todavía está en

discusión (Denison y Harter, 1995; Ribet y Drevon, 1995). La otra hipótesis relaciona al nitrato con la leghemoglobina, proteína soluble que conducen al oxígeno al bacteroide protegiendo a la nitrogenasa y permitiendo una eficiente fosforilación oxidativa (Appleby, 1984). En soja, el nitrato induce la formación de nitrosil-leghemoglobina que inhibe a la leghemoglobina y disminuye la difusión del oxígeno (Kanayama *et al.*, 1990). Hunt y Layzell (1993) sugiere que el nitrito transformado en nitrosil-leghemoglobina induce cambios en la afinidad de la leghemoglobina por el oxígeno, o en la concentración de leghemoglobina funcional, lo que conduciría a un cambio en la permeabilidad nodular.

Es evidente que el nitrato, en contraste con el amonio, no afecta la expresión de los genes *nodABC*. Por tanto el efecto del nitrato debe ser atribuido a un efecto de la planta huésped. De hecho la obtención de mutantes que son capaces de nodular en presencia o ausencia de nitratos denominados *nts* o **supernodulantes** ha evidenciado que la nodulación está influenciada por un proceso interno de la planta denominado autorregulación y que las hiper o supernodulantes carecen de él. La naturaleza del autorregulador no se conoce pudiendo estar involucrado el fitocromo (Carrol y Mathews, 1990) el nivel de flavonoides (Cho y Harper, 1991) algunas fitohormonas como el ácido abscísico (Phillips, 1971) las citoquininas (Sánchez-Díaz, 1996), las giberelinas (Lluch *et al.*, 1983; Sicardi di Mallorca, 1994) o el etileno (Grobbelaar *et al.*, 1971; Ligeró *et al.*, 1986). Ligeró *et al.* (1987) en experimentos realizados con aminoetoxivinil glicina (AVG), un potente inhibidor de la biosíntesis del etileno, observaron una relación entre concentración de nitrato en el medio y etileno liberado por raíces de alfalfa, sugiriéndose que la inhibición por el nitrato puede estar mediada por esta fitohormona (Ligeró *et al.*, 1991).

Por último se ha propuesto un mecanismo "feedback" que regula el crecimiento y la actividad nodular por la concentración de los compuestos nitrogenados reducidos en el floema (Parsons *et al.*, 1993). Si hay un nivel alto de compuestos nitrogenados reducidos se piensa que los nódulos inducirían un ajuste en el proceso de fijación (Oti-Boateng y Silsbury, 1993). Existen tres puntos potenciales de regulación: a nivel de las hojas maduras, a nivel del tallo y del nódulo. Si esta hipótesis se consensúa entre los expertos tendrá futuro aun cuando se necesitan evidencias experimentales que la verifiquen.

7. Nutrición inorgánica en la simbiosis.

La absorción de nutrientes en las leguminosas puede depender del genotipo de la planta (Drossopoulos *et al.*, 1994) de las prácticas de cultivo empleadas y de los cambios ambientales aéreos y terrestres (Peñuelas y Matamala, 1993). En consecuencia los tejidos vegetales acumulan peso seco y nutrientes minerales durante el crecimiento vegetativo que posteriormente serán transportados a las semillas durante el llenado de la vaina (Hanway y Weber, 1971). Las hojas reciben los iones procedentes de la solución nutritiva vía corriente transpiratoria. Se asume que la entrada de iones a las hojas está muy relacionada con el crecimiento y con la edad del cultivo, siendo en la madurez y con el desarrollo de otros sumideros metabólicos cuando estos órganos se transforman en exportadores (Murty y Ladhe, 1988).

Los nódulos radicales, como cualquier órgano vegetal, utilizan los nutrientes inorgánicos durante la fase de infección hasta el establecimiento de la fijación de nitrógeno. Muchos nutrientes están involucrados en el metabolismo necesario para el mantenimiento del nódulo, sin estar directamente relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno (O'Hara *et al.*, 1988; Rosendahl *et al.*, 1991).

En el suelo o medio de cultivo se encuentran los nutrientes requeridos por la planta y la bacteria. Para determinar si los nódulos disponen de los nutrientes inorgánicos adecuados para su desarrollo es necesario desarrollar criterios de respuesta de la bacteria a la deficiencia de nutrientes. Tales criterios pueden ser indicadores de exceso (síntesis de polifosfatos de reserva) o de limitación (disminución de enzimas extra o intracelulares, sistemas de transporte, etc). Las medidas de tales parámetros en el nódulo pueden ayudar a definir el estado nutricional del proceso simbiótico.

El **calcio** es un nutriente cuya influencia en la nodulación y la fijación de nitrógeno se lleva estudiando sistemáticamente sesenta años (Albrecht y Davis, 1929). El calcio es esencial en el crecimiento y multiplicación de *Rhizobium* (Vicent y Humphrey, 1968), tiene un papel importante en la formación del cordón de infección (Sethi y Reporter, 1981) y favorece el ataque o unión de la bacteria a la raíz (Caetano-Anollés *et al.*, 1989) mediante una proteína con calcio de peso molecular bajo denominada **rhicadhesina** localizada en la superficie celular (Smit *et al.*, 1989). También regula el crecimiento de *R. fredii* y su capacidad de nodular soja cv. Peking (Balatti *et al.*, 1991).

El **cobre** es esencial como nutriente en ambos simbioses. La función

bioquímica directa del cobre en el nódulo simbiótico no está clara (O'Hara *et al.* , 1988). Los nódulos con deficiencia de cobre contienen menos leghemoglobina y numerosas actividades oxidasas (Seliga, 1993); también se afecta el número de bacteroides (Cartwright y Hallsworth, 1970) y el acúmulo de taninos (Gajendiran y Mohaderan, 1990).

El **molibdeno** es requerido para la síntesis del cofactor FeMoCo de la nitrogenasa. Generalmente se acumula unido a proteínas, estando este proceso inhibido por el O₂ y el amonio (Pienkos y Brill, 1981) condiciones ambas que inhiben la nitrogenasa. En nódulos radicales la absorción de molibdeno solo se ha estudiado en *B. japonicum* (Graham y Maier, 1987). La absorción de molibdeno no se afecta por los inhibidores respiratorios pero sí por ionóforos (Maier y Graham, 1988) y el transporte en forma aniónica a través de la MPB depende del incremento de pH.

El níquel es un constituyente de la hidrogenasa (Evans *et al.* , 1987) y su deficiencia en el cultivo reduce la actividad hidrogenasa (Klucas *et al.* , 1983). Parecen existir dos sistemas de absorción de Ni en el bacteroide: uno que transporta Ni o Mg y otro específico para el Ni asociado al gen *hup* (Eberz *et al.* , 1989). La absorción del níquel no se afecta por los inhibidores metabólicos ni por los ionóforos, por tanto puede entrar en respuesta al gradiente de concentración. El níquel actúa a nivel del "processing" de la proteína estructural de la nitrogenasa (Brito *et al.* , 1994), habiéndose detectado un requerimiento de níquel para una óptima actividad hidrogenasa en diversas simbiosis como *R. loti* "birdsfoot" y *R. meliloti*/alfalfa (Monza *et al.*, 1993).

El **hierro** es requerido por los bacteroides en una amplia variedad de proteínas relacionadas con la fijación de nitrógeno (nitrogenasa, hidrogenasa, leghemoglobina y transportadores de electrones). Sin embargo soportan bien las deficiencias de hierro (Tang *et al.*, 1990). Los nódulos producen una gran variedad de quelatos férricos (Guerinot, 1990) incluyendo el ácido cítrico (Bosch *et al.* , 1988), el ácido antranílico (Rioux *et al.*, 1986), la rhizobactina (Schwyn y Neilands, 1987) y el catecol (Patel *et al.*, 1988) como sideróforos.

No se conoce el papel del **zinc** en la fijación biológica de nitrógeno. Hernández *et al.* (1995) han comprobado que altos niveles de zinc reducen significativamente el desarrollo de la parte aérea y el peso seco de los nódulos. También inhiben la actividad nitrogenasa y reducen el contenido de glicoproteína.

El **boro** resulta esencial en el desarrollo y funcionalidad del nódulos. La deficiencia de boro afecta más severamente a los nódulos en desarrollo que a los nódulos maduros (Yamagshi y Yamamoto, 1994). Bonilla y Bolaños (1996) establecen que el boro es esencial en: **a)** el ensamblaje de los principales componentes de la pared celular y en la estabilidad de la misma; **b)** en las interacciones entre planta y *Rhizobium* como moderador de señales de reconocimiento y **c)** juega un papel en el proceso de diferenciación del glucocáliz de la membrana peribacteroidea.

Las leguminosas como grupo no presentan mayores requerimientos de **fósforo** que las no leguminosas (Munns, 1977). Las leguminosas dependientes de la fijación de nitrógeno tampoco tienen mayores necesidades de fósforo que aquellas a las que se les suministra nitrógeno mineral. Sin embargo, Israel (1977) presenta resultados contrarios en plantas de soja con 97 días. El fósforo aumenta la concentración de nitrógeno en parte aérea, lo que se puede atribuir al aumento de la actividad específica del nódulo (Jacobsen, 1985). La adición de fósforo incrementa el peso seco de la planta, así como el número y peso seco de nódulos.

Se ha establecido que el reciclaje de ciertos elementos nutricionales entre raíz y tallo puede ser sustancial. En los elementos metabolizables este reciclaje ocurre a dos niveles: absorción y transporte de los elementos antes de su integración en diferentes macromoléculas (short-term) y cuando está asociado con el metabolismo de estas macromoléculas (long-term). Se dispone de información sobre el reciclaje del nitrógeno (Pate, 1980; Touraine *et al.* , 1988; Pereira y Larsson, 1993) del fósforo (Cakmak *et al.* , 1994; Fageria y Zimmermann, 1995) y potasio (Leschke *et al.* , 1985) en distintas especies de leguminosas.

La información recibida del estado nutricional de las hojas en leguminosas, puede ser útil para entender el desarrollo del cultivo y el valor nutritivo del mismo (Wilman *et al.* , 1994). Fleming (1973) refrenda el clásico concepto de la planta que se desarrolla con una relativamente alta concentración de iones minerales por peso seco en el crecimiento vegetativo, seguido de un proceso de dilución cuando el incremento del peso seco supera la absorción de nutrientes. Según Whitehead (1966) la concentración de N y P varía marcadamente con el desarrollo del cultivo mientras que K, Ca, Mg y Na generalmente se encuentran en concentración menor en la madurez que en el estado vegetativo. En el nódulo, Minchin *et al.* , (1994) relaciona la distribución de nutrientes con la barrera de difusión del oxígeno en el córtex nodular.

Recientemente se está potenciando la agricultura sostenible, un sistema agrícola que tiene en cuenta el potencial del suelo y el ambiente aprovechando los

mecanismos a través de los cuales las plantas interaccionan con la rizosfera liberando nutrientes que podrían no estar disponibles para la nutrición de la planta (Boyer, 1982). En este sentido el nitrógeno es el nutriente principal que puede limitar el crecimiento y la productividad del cultivo, el cual se requiere en todas las fases del desarrollo de la planta. La alta demanda de fertilizantes nitrogenados y los procesos que afectan el transporte y distribución del nitrógeno en el suelo y el agua, tienen que ser considerados en el estudio de sistemas agrícolas alternativos (Fernandes y Rosiello, 1995). El papel de las leguminosas puede ser trascendental en el desarrollo de tales cultivos.

II. Objeto



II. OBJETO.

La reducción del nitrógeno atmosférico y su asimilación en aminoácidos en los nódulos radicales de las leguminosas, conduce a que estas plantas puedan ser independientes de los fertilizantes nitrogenados. Muchos aspectos del proceso de nodulación y fijación del nitrógeno están regulados por la planta.

La contribución de la planta huésped a la simbiosis debe entenderse asumiendo que la nodulación está bajo control de la planta. Además, para la fijación del nitrógeno, la planta suministra ácidos orgánicos y otros productos formados en el nódulo a expensas del fotosintato o por la fijación oscura del CO_2 , que son utilizados como substratos por los bacteroides y esqueletos carbonados en la asimilación del amonio por la propia planta. Incluso la planta puede modificar sustancialmente la expresión de algunos caracteres de la bacteria como la actividad hidrogenasa, la producción de hidrógeno por la nitrogenasa y la reducción del dinitrógeno.

La inhibición de la fijación de nitrógeno por efecto del nitrato del medio parece estar relacionada con la nitrato reductasa nodular y da lugar a una serie de efectos como la ralentización del metabolismo del bacteroide por falta de substratos (ácidos orgánicos), la disminución del consumo de oxígeno por los bacteroides, la restricción a la difusión de oxígeno en el nódulo (controlada por la planta) y, en consecuencia, la inhibición de la nitrogenasa. La inhibición de la nodulación por el nitrato, sin embargo, parece estar mediada por la planta a través de un proceso hormonal en el que el etileno juega un papel primordial.

El cultivo de las habas presenta interesantes perspectivas económicas en nuestro país. La buena adaptación, su potencial de crecimiento, la riqueza proteica de sus semillas, los efectos beneficiosos sobre el cultivo siguiente. Sin embargo hay que tener en cuenta que la simbiosis *Rhizobium leguminosarum-Vicia faba* L. no ha recibido la atención, por parte de los investigadores, que han recibido otras simbiosis, quizás por la gran dificultad que presenta su manipulación bajo condiciones controladas. Esto explica que los estudios de *Vicia faba* L. tanto en simbiosis como no asociada a *Rhizobium*, sean escasos. Se trata por tanto de una leguminosa poco conocida, particularmente en lo que respecta a la simbiosis y metabolismo nodular en general.

Nuestro equipo de investigación, inició hace algunos años una línea de trabajo con *Vicia faba*, leguminosa de gran rentabilidad agrícola. Disponemos de una 30 líneas puras y varios cultivares comerciales de esta especie. Algunos de ellos ha sido

evaluados en cuanto a crecimiento, nodulación, calidad proteica del grano, eficacia en la fijación de nitrógeno, metabolismo del nitrato y asimilación del amonio. Aspectos relacionados con el estrés salino han sido objeto de algunos trabajos en nuestro laboratorio con esta especie y con otras leguminosas de interés agrícola como *Phaseolus vulgaris* y *Cicer arietinum*. Este trabajo tenía que ser completado con un estudio en profundidad del metabolismo carbonado en el nódulo.

El estudio de actividades enzimáticas de la fracción vegetal del nódulo relacionadas con el metabolismo y degradación de la sacarosa, principal producto de la fotosíntesis que se incorpora al nódulo, la vía de las pentosas-fosfato, la fijación oscura de CO₂ y la producción de ácidos dicarboxílicos que se aportan al bacteroide como sustrato energético, así como su relación con la eficacia de la fijación de nitrógeno y su condicionamiento por el genotipo de ambos simbioses o por la presencia de nitrato en el medio, comparando *Vicia faba* con una especie de origen tropical peor adaptada al nitrato del suelo como es *Phaseolus vulgaris*, es el ambicioso objetivo de nuestro trabajo.

Para alcanzar este objetivo se propuso el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio de la ontogenia del cultivo de *Vicia faba* llevando a cabo distintos muestreos a lo largo del crecimiento del cultivo, para determinar la duración de los diferentes estados fenológicos de la planta y, en especial, de los nódulos (crecimiento vegetativo, inicio de floración, floración, maduración de los nódulos, senescencia, etc.). Se estudió, además, la respuesta de algunos procesos metabólicos durante estos periodos.
2. Influencia de la cepa de *Rhizobium* en simbiosis con *Vicia faba* sobre los procesos metabólicos estudiados y su efecto sobre el crecimiento de la planta y eficacia en la fijación de nitrógeno.
3. Caracterización del metabolismo carbonado nodular en el germoplasma de *Vicia faba*. Este estudio se ha realizado con doce líneas puras y un cultivar comercial, contrastándose el comportamiento de estos genotipos en cuanto a procesos metabólicos del nódulo.
4. Estudio del efecto del nitrógeno en forma de nitrato aplicado al inicio del cultivo (long term) y al final del crecimiento vegetativo (short term) sobre el metabolismo nodular. Como estudio comparativo estos ensayos se realizaron con *Vicia faba* y *Phaseolus vulgaris*, leguminosa de origen tropical con mayor dependencia del nitrato del medio.

5. Estudio de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la fracción vegetal de los nódulos de *Vicia faba*, purificación y caracterización de la enzima, considerándose como una contribución más en el conocimiento de las enzimas del nódulo de *Vicia faba*.

III. Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico.

1.1. Material vegetal.

Las especies vegetales utilizadas en este trabajo han sido el haba (*Vicia faba* L.) y la judía (*Phaseolus vulgaris* L.). El haba es una leguminosa grano de interés agrícola y económico, de gran implantación en el área mediterránea. Prioritariamente se ha utilizado el cultivar comercial Alborea, suministrado por Semillas Pacífico S.A. (Sevilla), frecuentemente usado en Andalucía en alimentación humana y animal por su buena adaptación y elevados rendimientos. Además, se han realizado experimentos con varias líneas puras de *Vicia faba* L. (tabla 1) pertenecientes a una extensa colección de germoplasma de esta especie, seleccionadas por cruzamiento y autofecundación por el Dr. D. Antonio Martín (Dpto. de Mejora Genética, ETSIA, Universidad de Córdoba).

Tabla III.1. Denominación y algunas características de los genotipos de *V. faba* utilizados en el presente trabajo.

Denominación	Floración (días)	Color flor	Color semilla	Color hilo	Origen ^(a)	Variedad botánica ^(b)
VF17	45	Negro	Burdeos	Blanco	Córdoba	3-4
VF22	33	Blanco	Marrón	Marrón	Córdoba	2
VF31	25	Negro	Hueso	Negro	Egipto	1
VF44	53-54	Negro	Negro	Negro	R.U.	2
VF50	47	Blanco	Marrón	Marrón	Córdoba	1
VF64	31	Negro	Marrón	Blanco	Córdoba	2
VF72	34	Marrón	Marrón	Negro	Córdoba	2
VF83	47	Blanco	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF112	27	Blanco	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF125	26	Negro	Marrón	Negro	Córdoba	2
VF147	43-44	Negro	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF166	43-44	Negro	Marrón	Negro	Córdoba	3
ALBOREA	40-41	Negro	Hueso	Negro	Comercial	3

(a) Origen: Córdoba, obtenidas en el Departamento de Mejora Genética de la ETSIA de la Universidad de Córdoba; R.U., Reino Unido.

(b) Variedad botánica y tamaño de grano: mayor (1) > equina (2) > minor (3) > paucijuga (4).

La judía es una leguminosa de origen tropical, de gran importancia económica por su amplia implantación en alimentación. Se ha utilizado el cultivar Contender, suministrado por Semillas Bolivar (Granada)

1.2. Microorganismos.

Las cepas silvestres de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, utilizadas en este trabajo (tabla 2) fueron aisladas de nódulos radicales de *V. faba* procedentes de suelos de diversas localidades de la provincia de Granada. La selección de cepas se realizó según los ensayos de competitividad, infectividad y efectividad realizados por Hervás (1991).

Tabla III.2. Denominación y lugar de procedencia de las cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viciae* utilizadas.

Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia
GRA19	Alhama	GRL8	Loja	GRI7	Iznalloz
GRC17	Cubillas	GRL16	Loja	GRI24	Iznalloz
GRC20	Cubillas	GRL19	Loja	GRI32	Iznalloz
GRC37	Cubillas	GRL22	Loja	GRLM25	La Malahá

Para el experimento con *Phaseolus vulgaris* se utilizó la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Quinto *et al.*, 1982).

2. Medios de cultivo

2.1. Solución nutritiva para plantas

La solución nutritiva para el cultivo de plantas ha sido descrita por Rigaud y Puppo (1975), siendo su composición la que se expone en la tabla III.3.

2.2. Medio de cultivo para *Rhizobium*.

El medio de cultivo empleado para la conservación y multiplicación (preparación del inóculo) del microorganismo fue el medio sólido Allen 79 (Allen, 1957). Su composición se expone en la tabla III.4.

Los medios de cultivo bacteriano fueron distribuidos en tubos inclinados en pico de flauta. En ellos se conservaron las cepas de uso rutinario manteniéndose a 4°C y

resembrándose cada 2 ó 3 meses. Para evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento, se guardaron a -20°C adicionados de glicerol al 50% (v/v).

Tabla III.3. Composición de la solución nutritiva utilizada para el cultivo de las plantas (Rigaud y Puppo, 1975).

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH_2PO_4	0.200 g	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.200 g	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
KCl	0.200 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.120 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.003 g
Na_2FeEDTA (Secuestrene)	0.025 g	H_3BO_3	0.018 g
		$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.12 mg

Agua 1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 ± 0.1 con KOH y se esteriliza en autoclave a 117°C durante 30 min.

Tabla III.4. Composición del medio de cultivo Allen 79 (Allen, 1957).

K_2HPO_4	0.6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
CaCO_3	1.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaCl	0.2 g
Manitol	7.6 g
Glucosa	2.4 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Antes de esterilizar a 117°C durante 20 min, el pH se ajusta a 7.0-7.2.

3. Cultivo de plantas.

El cultivo de las plantas se ha llevado a cabo mediante cultivo hidropónico en jarras Leonard (Leonard, 1943) de 1.5 l de capacidad, con vermiculita como sustrato

inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. Las jarras Leonard constan de 2 partes de vidrio que encajan perfectamente. La parte superior contiene el sustrato y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel secante asciende la solución por capilaridad, manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Se esterilizan en autoclave a 117°C durante 1 h y 30 min.

3.1. Esterilización y germinación de las semillas.

Las semillas de leguminosas se esterilizaron en superficie con etanol (96%) durante 2 min y medio, lavando después con abundante agua destilada estéril al objeto de eliminar los restos de etanol. Tras la esterilización se dejaron en imbibición durante 3 ó 4 h. Transcurrido este tiempo, se colocaron en semilleros de vermiculita estéril y convenientemente humedecida. La esterilización de semillas y la preparación de los semilleros se llevó a cabo en cámara de flujo laminar (Micro H Telstar) para prevenir contaminaciones. Los semilleros se cubrieron con bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad y se mantuvieron en oscuridad durante 72 h a 26°C en estufa de germinación.

3.2. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de cultivos frescos (72 h) en medio sólido a los que se adicionó solución nutritiva estéril para conseguir, por agitación mecánica, una suspensión bacteriana de $\approx 10^9$ células·ml⁻¹.

3.3. Siembra e inoculación

En cada jarra Leonard estéril se siembran, en condiciones axénicas, dos semillas pregerminadas (1-3 cm de radícula) aplicándose a cada una 1 ml de inóculo. Una vez inoculadas se cubren con vermiculita y sobre la superficie de la vermiculita se coloca una capa de perlita estéril, que disminuye el riesgo de contaminación evitando a la vez las pérdidas de agua por evaporación (Caba, 1991). Antes de trasladar las jarras Leonard a la cámara de cultivo se revisten con papel a fin de mantener la raíz en oscuridad.

3.4. Condiciones de la cámara de cultivo

En todos los experimentos realizados las plantas fueron cultivadas en una cámara Conviron GB4S con las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperiodo: 16h luz/ 8h oscuridad
- Temperatura: 23 ± 1 °C día/ 17 ± 1 °C noche
- Humedad relativa: 55% día/ 75% noche
- Intensidad luminosa: $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (400-700 nm) en la superficie de las macetas, suministrada por fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW-VHO) y lámparas incandescentes de 40 vatios (30% del total de vatios).

Las jarras Leonard se distribuyeron sobre la mesa de cultivo completamente al azar, cambiándose de forma periódica de lugar. Cada siete días al principio y cada tres a partir de la tercera semana, se cambió el recipiente inferior de la jarra Leonard por otro con solución nutritiva fresca y estéril.

4. Experimentos realizados.

El presente estudio sobre el metabolismo carbonado en nódulos de *V. faba* ha sido estructurado en cinco fases o tipos de experimentos:

- 1) Caracterización general del metabolismo carbonado y eficiencia de la fijación del nitrógeno en nódulos de *Vicia faba* a lo largo de la ontogenia del cultivo.
- 2) Estudio del efecto de la cepa de *Rhizobium* utilizada como microsimbionte en la utilización del carbono por el nódulo.
- 3) Comportamiento de diferentes líneas puras de *V. faba*.
- 4) Efecto de la concentración de nitrato en la solución nutritiva.
- 5) Purificación y caracterización de la PEPC de la fracción vegetal de los nódulos de *Vicia faba*.

En los cuatro primeros experimentos se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Crecimiento y nodulación:
 - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea, relación de peso seco de raíz/parte aérea y peso normalizado de nódulos

b) Actividades enzimáticas del metabolismo nitrogenado en nódulos:

- Nitrogenasa:
 1. Actividad reductora de acetileno
 2. Producción de hidrógeno en aire
 3. Eficiencia relativa

c) Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos:

- Fosfoenolpiruvato carboxilasa
- Glucosa-6P deshidrogenasa
- 6-fosfogluconato deshidrogenasa
- Malato deshidrogenasa
- Isocitrato deshidrogenasa
- Sacarosa sintasa
- Invertasa alcalina

d) Determinaciones analíticas:

- Proteína soluble en nódulos
- Nitrógeno reducido en el material vegetal
- Contenido en K, Na, Ca y Mg en raíz y parte aérea

4.1. Caracterización general del metabolismo carbonado y eficiencia de la fijación del nitrógeno en nódulos de *Vicia faba* a lo largo de la ontogenia del cultivo.

Se utilizó el cultivar comercial Alborea de *V. faba* inoculado con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* biovar. *viciae*. Las plantas crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva adicionada de 2 mM de KNO₃, concentración descrita como no inhibidora de la nodulación (Streeter, 1982). Se realizaron recogidas cada 2 a 4 días entre los 14 y 52 días de cultivo, con un total de trece muestreos. En cada recogida se utilizaron 3 jarras (6 plantas). El experimento se realizó dos veces, determinándose los parámetros indicados en el apartado 4, salvo el contenido en K, Na, Ca y Mg que no se determinó en este experimento.

4.2. Efecto de la cepa de *Rhizobium* utilizada para la inoculación.

Con objeto de estudiar el efecto de la cepa de *Rhizobium* sobre la eficiencia de la simbiosis en cuanto a la fijación de nitrógeno, el crecimiento y las actividades

enzimáticas del metabolismo carbonado en los nódulos, en este experimento se utilizaron diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* (Tabla 2). Se prepararon ocho plantas (4 jarras) del cultivar comercial Alborea de *V. faba* inoculadas con cada una de las cepas de *Rhizobium*. La solución nutritiva, al igual que en el experimento anterior, se adicionó de 2 mM KNO₃. Las plantas se recogieron al final del periodo de crecimiento cuando aparecen los primeros botones florales, lo que en este cultivar ocurrió el día 32 del cultivo. El experimento se repitió al menos una vez para cada una de las cepas, determinándose los parámetros expuestos en el apartado 4.

4.3. Efecto del genotipo de la planta sobre el crecimiento, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.

Este experimento permitió estudiar la influencia del genotipo de la planta huésped sobre la eficiencia simbiótica, para lo cual en este estudio se emplearon los genotipos de *Vicia faba* expuestos en el apartado 1.1. (Tabla 1) de esta memoria. Se utilizaron ocho semillas (4 jarras) de cada genotipo, inoculándose con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*. La solución nutritiva se adicionó de 2 mM KNO₃. Las plantas se recogieron al final del periodo vegetativo marcado por la aparición de los botones florales, siendo la duración de dicho periodo distinta para cada genotipo. El experimento se repitió al menos una vez para cada genotipo y se determinaron los parámetros relacionados en el apartado 4.

4.4. Influencia del nitrato y su interacción con la fijación de nitrógeno.

En este experimento se abordó el estudio del efecto de una concentración alta de nitrato (8 mM) sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo, fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado de los nódulos.

Utilizamos *Vicia faba* cv. Alborea, inoculado con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *Phaseolus vulgaris* var. Contender inoculado con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a fin de comparar el efecto del nitrato sobre dos especies de leguminosas con distinto grado de tolerancia al nitrato.

La aplicación del nitrato determinó dos tipos de experimentos distintos: **a)** cuando el nitrato se adiciona al inicio del cultivo **b)** cuando el nitrato se adiciona una semana antes del inicio del período reproductor, cuando la simbiosis está establecida.

Para ello se efectuaron dos tratamientos: 8 mM de nitrato desde la siembra (**tratamiento A**) y 2 mM desde la siembra suplementando hasta 8 mM de nitrato una semana antes de la aparición de los botones florales (**tratamiento B**). Como control se utilizaron plantas a las que se suministró 2 mM de nitrato durante todo el período de cultivo. A las plantas sometidas al tratamiento B se les suministró 8 mM de nitrato una semana antes de la floración que en habas fue el día 25, realizándose las recogidas el día 25, 26, 29, 32 y 39 de cultivo, y en judías fue el día 19, efectuándose los muestreos el día 19, 20, 24, 28 y 34 de cultivo.

5. Metodología empleada.

5.1. Análisis del crecimiento.

En el momento de la recogida se procedió a sacar las plantas de las jarras Leonard y a lavar las raíces abundantemente con agua para eliminar los restos de vermiculita. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, secando el exceso con papel de filtro. Tras la toma de muestras para la determinación de las actividades de la nitrogenasa (apartado 5.2) los nódulos de cada planta se aislaron, registrándose inmediatamente su peso fresco. A continuación, se mezclaron de modo uniforme por tratamiento y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

Posteriormente se separó parte aérea y raíz, disponiéndose ambos en estufa de corriente forzada de aire a 70°C durante 24 h. Pasado este tiempo, fue determinado el peso seco de cada órgano. El peso seco de los nódulos se calculó mediante la obtención de un factor PS/PF calculado a partir de varias muestras pesadas cada día antes y después del secado.

Se consideró interesante calcular a efectos comparativos, una tasa de acumulación de materia seca, que fue obtenida dividiendo el peso seco de la planta por número de días de cultivo que se expresó en $\text{mg PS} \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$. Para los nódulos se calculó su peso normalizado, resultado de dividir el PS de nódulos por el de parte aérea, expresándose en $\text{mg PS nódulos} \cdot (\text{g PSPA})^{-1}$. Se considera una medida más adecuada para estimar el desarrollo de la nodulación así como para reconocer el efecto que sobre este proceso pueden tener factores como la cepa de *Rhizobium*, el genotipo de la planta, etc. (Streeter, 1985).

5.2. Actividades de la nitrogenasa.

La producción de hidrógeno y la reducción de acetileno por la nitrogenasa (EC 1.7.99.2) se determinó en muestras de raíz (2 g) constituidas por fragmentos de 2 a 4 cm con nódulos adheridos (0.2-0.4 g de peso fresco) (Herdina y Silsbury, 1990a). Tanto la producción de hidrógeno como la reducción de acetileno se midieron secuencialmente sobre las mismas muestras al objeto de poder calcular la eficiencia relativa de la simbiosis, optimizándose el ensayo para invertir el mínimo tiempo posible (Phillips *et al.*, 1990).

5.2.1. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa.

La producción de hidrógeno concomitante con la reducción de nitrógeno por la nitrogenasa fue medida utilizando cromatografía gaseosa (Schubert y Evans, 1976; Bédmar *et al.*, 1983; Sellstedt y Winship, 1987). Las muestras de raíz nodulada descritas en el párrafo anterior, se colocaron en frascos de vidrio de unos 60 ml de capacidad, con tapón de rosca perforado y provisto de un disco de silicona que asegura su cierre hermético. Tras 20 min de incubación en oscuridad a 25°C, se tomaron muestras de 1 ml de la atmósfera que rodea a la raíz para cuantificar el H₂ producido mediante cromatografía gaseosa. Se realizaron 6 repeticiones y la producción de hidrógeno se expresó en $\mu\text{mol H}_2 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Konik, modelo KNK-3000-HRGC, equipado con un detector de conductividad térmica y una columna de acero inoxidable de 2 mm x 2 m empaquetada con un polímero poroso de 60-80 mesh y discriminación molecular de 5 Å. Como gas portador se utilizó argón a un flujo de 25 ml·min⁻¹. Las temperaturas del horno, detector e inyector fueron 45, 60 y 100°C respectivamente, siendo la intensidad de corriente a través del filamento del detector de 100 mA. Los picos de hidrógeno fueron identificados y cuantificados mediante comparación con los obtenidos usando un patrón de H₂ (Scotty Analyzed Gases, Alltech Associates Inc.) preparado en nitrógeno a una concentración de 40 nmol·ml⁻¹.

5.2.2. Actividad reductora de acetileno.

El flujo total de electrones a través de la nitrogenasa fue evaluado por el test de reducción de acetileno mediante cromatografía gaseosa (Burris, 1972), según la metodología descrita por Hervás (1988). Tras la adición de acetileno se tomaron

muestras a los 10 y 20 min de la atmósfera que rodea a la raíz para cuantificar el etileno producido y la actividad se expresó en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Para esta determinación se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8600, equipado con un detector de ionización de llama y una columna. Las temperaturas del horno, detector e inyector fueron 74, 105 y 120°C respectivamente.

5.2.3. Cálculo de la eficiencia relativa.

La eficiencia relativa (ER) de la fijación de nitrógeno por la actividad nitrogenasa, se calculó a partir de los valores obtenidos para la producción de hidrógeno y la actividad reductora de acetileno, según la ecuación propuesta por Schubert y Evans (1976):

$$\text{ER} = 1 - \frac{\text{H}_2 \text{ desprendido en aire}}{\text{acetileno reducido}}$$

5.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos.

5.3.1. Preparación de extractos libres de células del citosol nodular.

Se utilizaron dos medios de extracción, según la actividad enzimática a determinar: **a)** usado para las actividades PEPC, MDH, G6PDH, 6PGDH e ICDH, consistió en tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8, adicionado de sacarosa 100 mM, β -mercaptoetanol 2% (v/v) y etilenglicol 20% (v/v). **b)** usado para la extracción de las actividades SS e IA, consistió en tampón fosfato potásico 50 mM pH 8, adicionado de 1 mM EDTA y 20% etilenglicol.

Los nódulos se homogeneizaron en mortero con medio de extracción en una proporción de peso/volumen que varió según la enzima y polivinilpirrolidona (PVPP) insoluble en una cantidad equivalente al 50% del peso fresco de la muestra de nódulos. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa, a continuación se clarificó por centrifugación, a 2500 g durante 5 min para eliminar restos de tejido y células, y posteriormente a 30000 g durante 20 min, en una centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed RC-5B (DuPont Instruments) a 4°C. Se obtiene así una solución nítida con las proteínas solubles del citosol del nódulo, que se empleó como fuente de las enzimas. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en baño de hielo picado a una temperatura entre 0 y 4°C.

5.3.2. Valoración de las actividades enzimáticas.

Las actividades enzimáticas estudiadas en este trabajo se han valorado por medio de la oxidación o reducción de NAD(P)H/NAD(P)⁺ producida en la propia reacción o en una reacción acoplada, con la excepción de la actividad invertasa alcalina cuyo método se explica en el apartado 5.3.9. La valoración de la actividad en reacciones enzimáticas en las que se produce oxidación o reducción de piridín nucleótidos, se realiza siguiendo la variación de absorbancia a 340 nm debida a la aparición o desaparición de la forma reducida, que presenta un máximo de absorción a dicha longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar que es igual para el NADH y el NADPH.

La mezcla de reacción utilizada varió para cada enzima. La reacción se inicia con la adición del extracto. Tras una fase lag de 10 min, salvo en el caso de la MDH que fue de solo 6 min, la variación de absorbancia, lineal durante al menos 6 minutos más, se registró durante 4 min. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-70 termostatzado a 30°C. En todos los casos se prepararon 4 repeticiones y un control sin sustrato para corregir las posibles oxidaciones o reducciones endógenas de NAD(P)H/NAD(P)⁺ según los casos.

El cálculo de las actividades enzimáticas acopladas a una reacción de oxidoreducción NAD(P)H/NAD(P)⁺ se realiza según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol min}^{-1}) = \frac{(\Delta \text{ D.O. min}^{-1}) V V_T}{10^{-6} \epsilon d v}$$

donde,

$\Delta \text{ D.O. min}^{-1}$ = incremento medio de D.O. por minuto (valor absoluto).

V = volumen total de la mezcla de reacción en ml

V_T = volumen total de extracto en ml

ϵ = coeficiente de extinción molar del NAD(P)H = $6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

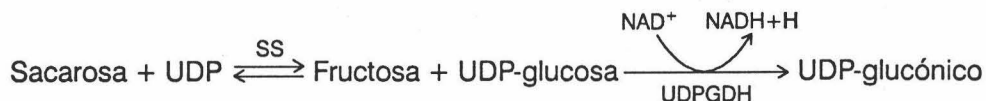
d = ancho de la cubeta = 1 cm

v = volumen de extracto añadido a la mezcla en ml

10^{-6} = para expresar la actividad en micromoles

5.3.3. Actividad sacarosa sintasa.

La sacarosa sintasa hidroliza la sacarosa en presencia de UDP, produciendo UDP-glucosa que se oxida por la UDP-glucosa deshidrogenasa en presencia de NAD^+ que se reduce, pudiéndose medir el incremento de absorbancia a 340 nm. Todo el proceso se representa en el siguiente esquema:



Los extractos para la valoración de esta actividad se prepararon homogeneizando los nódulos en un mortero con el medio de extracción **b** (Apartado 5.3.1.) en una proporción 1/12 (p/v).

La mezcla de reacción, optimizada a partir de la descrita por Morell y Copeland (1985), fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
Sacarosa	100.0 mM
UDP	2.0 mM
UDPG deshidrogenasa	250.0 μg
NAD^+	1.5 mM

La reacción se inicia con la adición de 25 μl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. El resto del procedimiento es igual al ya descrito (apartado 5.3.2.). La actividad sacarosa sintasa se expresó en $\mu\text{mol NAD}^+_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1} \text{ h}^{-1}$ o en $\text{nmol NAD}^+_{\text{red}} \text{ min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$.

5.3.4. Actividad invertasa alcalina.

La invertasa alcalina hidroliza la sacarosa según la siguiente reacción:



Los extractos se prepararon igual que para la sacarosa sintasa. El procedimiento para el ensayo se optimizó a partir del descrito por Morell y Copeland (1984). La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 20 mM pH 7.5, 100

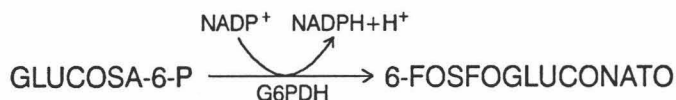
mM de sacarosa y, según los casos, 150 o 200 μl de extracto hasta un volumen final de 1 ml. Se incuba la mezcla durante 30 min a 30°C y se para la reacción en un baño hirviendo durante 2 min. A continuación se centrifuga para eliminar las proteínas precipitadas y se determina la glucosa producida por el método de Bergmeyer y Bernt (1974), para lo que se añaden 200 μl de la mezcla de reacción a 5 ml de la mezcla de determinación de glucosa que se compone de:

Tampón fosfato potásico . . .	200.0 mM
Peroxidasa	1.5 U ml^{-1}
Glucosa oxidasa	9.0 U ml^{-1}
o-Dianisidina	5.0 mg ml^{-1}

Este método se basa en la reacción de oxidación de la D-glucosa por la glucosa oxidasa (β -D-glucosa-oxígeno 1 oxidoreductasa, EC 1.1.3.4) que forma δ -gluconolactona, la cual se hidroliza espontáneamente produciendo ácido D-gluconico más H_2O_2 . Esta molécula de peróxido de hidrógeno oxida a la o-dianisidina por medio de la peroxidasa (donador: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.7) produciendo la o-dianisidina oxidada que presenta un amplio máximo de absorción alrededor de 460 nm. El coeficiente de extinción en este caso depende de las condiciones experimentales, por lo que la medida se hace con referencia a una curva patrón de glucosa.

5.3.5. Actividad glucosa-6-P deshidrogenasa.

La glucosa-6-P deshidrogenasa cataliza la oxidación de la glucosa-6-P que se transforma en 6-Pgluconato reduciendo al NADP^+ de acuerdo con la siguiente ecuación:



La preparación de los extractos para la valoración de esta actividad se hizo utilizando el medio de extracción a (Apartado 5.3.1.). Previamente se ensayaron distintos medios de extracción como HEPES-KOH 50 mM pH 7.5 adicionado de manitol 0.4 M, EDTA 2 mM y DTT 5 mM (Anthon y Emerich, 1990), TRIS-HCl 50 mM pH 8 adicionado de MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM

(Copeland *et al.*, 1989), obteniéndose el resultado óptimo con el tampón Maleico-KOH por lo que se realizó la extracción igual que para las demás actividades, con la adición de 1 mM de NADP⁺ al medio de extracción.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

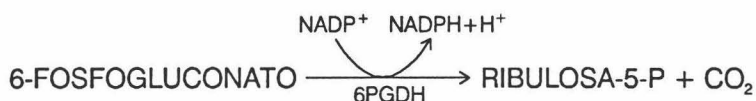
Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
Glucosa-6-P	2.5 mM
MgCl ₂	10.0 mM
NADP ⁺	0.5 mM
6-P-gluconato DH	0.33 U

Se añadieron 25 µl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. La reacción se inicia con la adición del extracto. La línea obtenida en este caso presenta pendiente positiva debido al aumento de absorción por la formación de NADPH.

Para el cálculo de esta actividad enzimática hay que tener en cuenta que la glucosa-6-P deshidrogenasa produce 6-fosfogluconato que es transformado a su vez por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, produciéndose 2 moles de NADPH por mol de glucosa-6-P transformado. Por tanto, la actividad total calculada por medio de la ecuación expuesta en el apartado 5.3.2. hay que dividirla por 2 para obtener la actividad correspondiente a la glucosa-6-P deshidrogenasa. La actividad G6PDH se expresó en µmol NADP⁺_{red} (g PF)⁻¹ h⁻¹ o en nmol NADP⁺_{red} min⁻¹ (mg proteína)⁻¹.

5.3.6. Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa cataliza la oxidación del 6-fosfogluconato reduciendo al NADP⁺ según la ecuación:



La preparación de los extractos fue la misma que para la enzima anterior, habiéndose ensayado los mismos medios de extracción (Anthon y Emerich, 1990).

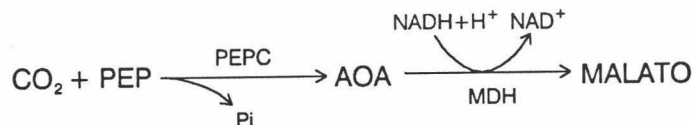
La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
6-fosfogluconato	2.5 mM
MgCl ₂	10.0 mM
NADP ⁺	0.5 mM

Se inició la reacción añadiendo 25 µl o 50 µl de extracto, según los casos, para completar un volumen final de 1 ml. El cálculo de la actividad es idéntico al descrito anteriormente (apartado 5.3.2.). La actividad 6PGDH se expresó en µmol NADP⁺_{red} (g PF)⁻¹ h⁻¹ o en nmol NADP⁺_{red} min⁻¹ (mg proteína)⁻¹.

5.3.7. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) cataliza transformación del fosfoenolpiruvato a oxalacetato el cual se transforma a su vez en malato por acción de la malato deshidrogenasa (MDH) mediante la oxidación de NADH, según la siguiente ecuación:



La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa se extrajo utilizando el medio de extracción a (Apartado 5.3.1.) y se valoró espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm provocada por la oxidación del NADH en una reacción acoplada a la actividad malato deshidrogenasa endógena. El ensayo, optimizado a partir de la metodología descrita por Vance *et al.* (1984) se realizó a 30°C con la siguiente mezcla de reacción:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	0.1 M
NaHCO ₃	10.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
PEP	2.0 mM
NADH	0.2 mM

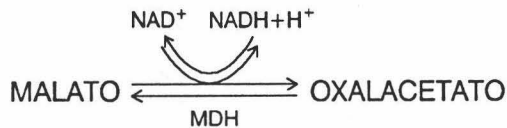
Se inicia la reacción añadiéndose 25 µl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. En los ensayos de actividad malato deshidrogenasa se comprobó que dicha actividad en los extractos nodulares es del orden de cinco a diez veces superior a la fosfoenolpiruvato carboxilasa, lo que hace innecesario añadir malato deshidro-

genasa exógena a la mezcla de reacción.

La gráfica de la representación de la absorbancia en el tiempo presenta pendiente negativa debido a la oxidación de NADH a NAD⁺. La actividad PEPC se expresó en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} (\text{g PF})^{-1} \text{ h}^{-1}$ o en $\text{nmol NADH}_{\text{ox}} \text{ min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$.

5.3.8. Actividad malato deshidrogenasa.

La malato deshidrogenasa transforma el malato en oxalacetato en un proceso reversible que se esquematiza a continuación:



Se prepararon los extractos con el medio de extracción a (apartado 5.3.1.) pero tuvieron que ser diluidos 10 veces, dado el alto nivel de actividad malato deshidrogenasa que se presenta en nódulos. Esta enzima utiliza NAD⁺ como cofactor.

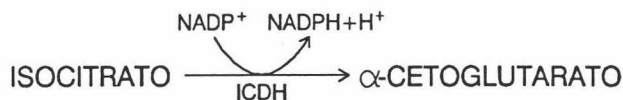
La mezcla de reacción, puesta a punto para este trabajo, fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
Malato sódico	40.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
NAD ⁺	4.0 mM

La reacción se inicia con la adición de 25 μl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. Sin embargo, la fase lag es más breve, de 6 min, siendo el resto del procedimiento igual al ya descrito (apartado 5.3.2.). La actividad MDH se expresó en $\mu\text{mol NAD}^+_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1} \text{ h}^{-1}$ o en $\text{nmol NAD}^+_{\text{red}} \text{ min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$.

5.3.9. Actividad isocitrato deshidrogenasa.

La NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa transforma el isocitrato según el siguiente proceso:



La determinación de la actividad NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa (NADP⁺-ICDH) citosólica de los nódulos de *Vicia faba* se optimizó a partir de la metodología descrita por Chen *et al.* (1988). El extracto se preparó con el mismo medio de extracción que las enzimas anteriores, manteniendo en este caso la proporción de 1/24 (p/v) de nódulos y tampón de extracción.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón bicina-KOH pH 8.5	100.0 mM
Isocitrato	1.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
NADP ⁺	0.5 mM

Se inicio la reacción añadiendo 25 µl de extracto para completar un volumen final de 1 ml. En este caso, la rutina fue idéntica a la descrita anteriormente (Apartado 5.3.2.) y la recta resultante presenta pendiente positiva. La actividad ICDH se expresó en µmol NADP⁺_{red} (g PF)⁻¹ h⁻¹ o en nmol NADP⁺_{red} min⁻¹ (mg proteína)⁻¹.

5.4. Determinaciones analíticas realizadas en nódulos.

5.4.1. Determinación de proteína soluble.

Se utilizó el método descrito por Bradford (1976), basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas.

Se utilizaron alícuotas de 0.1 ml convenientemente diluidas para que contengan entre 10 y 50 µg de proteína, a las que se añadió 5 ml de reactivo Bradford y tras agitar se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 min y antes de 1 h.

El cálculo de la concentración de proteínas se realizó por comparación con una curva patrón de seroalbúmina bovina (Merk, fracción V) preparada con cantidades comprendidas entre 10 y 50 µg.

5.5. Determinaciones realizadas en parte aérea y raíz.

El material seco y molido (polvo fino y homogéneo) se sometió a un proceso de mineralización por vía húmeda, siguiendo la técnica propuesta por Peach y Tracey (1956) descrita por Lachica *et al.* (1973).

5.5.1. Determinación de nitrógeno.

El nitrógeno se valoró por el método de Kjeldahl, utilizando el sistema de Bouat (Bouat y Groucet, 1965), basado en la valoración del NH_3 formado al reaccionar el mineralizado con NaOH . El arrastre del vapor de amoníaco se lleva a cabo por corriente de aire, lo que permite además vaciar el contenido del matraz colector una vez finalizada la valoración de cada muestra. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular Beckman-25.

Los valores se expresaron finalmente en mg N planta^{-1} y como en el caso del crecimiento se calculó la tasa de adquisición de N, expresada en $\text{mg N planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

5.5.2. Determinación de potasio y sodio.

Se realizó por fotometría de llama, utilizando un fotómetro de llama Corning 400. Esta técnica se basa en las radiaciones que emite un determinado elemento, estimulado térmicamente, cuando vuelve a su estado inicial. Estas radiaciones se deben a que algunos de sus electrones pasan a un nivel energético superior, liberando esta energía en forma de radiación cuando vuelve a su órbita usual. La intensidad de radiación emitida es proporcional a la concentración del elemento en el material.

El cálculo de la concentración de potasio y sodio se hizo según una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de los elementos.

5.5.3. Determinación de calcio y magnesio.

Estos elementos se han determinado por espectrofotometría de absorción atómica, utilizando las líneas 4224 \AA (Ca) y 2852 \AA (Mg) con llama oxidante aire-acetileno. Esta técnica se basa en la propiedad que tienen los átomos que se encuentran en su estado elemental de captar una radiación de frecuencia determinada. El átomo pasará por diferentes niveles energéticos, según la frecuencia del fotón que absorbe.

La determinación de magnesio se realiza directamente sobre el mineralizado, pero para el calcio debe adicionarse lantano, debido a que puede formar compuestos, difícilmente atomizables en la llama, que pueden interferir por sus características refractarias.

Las lecturas de estos macronutrientes se realizan directamente en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 1100 B.

6. Presentación y estudio estadístico de los resultados.

En los cuatro tipos de experimentos se utilizó un diseño completamente al azar, distribuyendo las macetas de cada tratamiento siempre de forma totalmente aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los experimentos fueron repetidos al menos una vez, considerándose los valores más representativos. Los datos originales así obtenidos se sometieron a un análisis estadístico asistido por ordenador con la ayuda del programa Statgraphics versión 5 (STSC Inc., Rockville, Maryland, U.S.A.) consistente en:

- Análisis de la varianza con una o dos entradas.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias
- Coeficientes de correlación simple entre variables

En el primer experimento, los datos de crecimiento de los diferentes órganos y de la planta completa se ajustaron a ecuaciones de regresión.

Los resultados se presentan en gráficas, diagramas de barra o histogramas y tablas de medias.

7. Estudio sobre la fosfoenolpiruvato carboxilasa de nódulos de *Vicia faba*: purificación parcial y caracterización.

7.1. Purificación parcial.

Para la obtención de nódulos se sembraron semillas de *Vicia faba* cv. Alborea, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*. Las plantas se cultivaron en jarras Leonard provistas de solución nutritiva (Rigaud y Puppo, 1975) adicionada con 2 mM KNO₃, como se ha descrito en el apartado de material y métodos.

A los 30 días se recogieron las plantas, lavándose las raíces con agua abundante para eliminar los restos de vermiculita. Se separaron los nódulos radicales y se almacenaron en congelador a -80°C.

7.1.1. Extracción.

Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a una temperatura entre 0 y 4°C. La extracción se realizó en un mortero sobre baño de hielo picado utilizando 10g de nódulos y 40 ml de medio de extracción compuesto por fosfato potásico 20 mM, pH 7.8, etilenglicol 20% (v/v), EDTA 1mM y DTT 100 mg/l, adicionándose 2 g de PVPP insoluble. El homogenado se filtró a través de dos capas de gasa y se centrifugó a 30000 g durante 20 min en centrífuga refrigerada, utilizándose el sobrenadante para los posteriores pasos de purificación.

7.1.2. Medida de la actividad.

A lo largo del proceso de purificación, se midió la actividad del extracto obtenido en cada etapa, así como de las fracciones obtenidas durante las etapas de cromatografía. La medida de la actividad PEPC se realizó como se ha explicado en el apartado 5.3.2. aunque con ciertas modificaciones. Puesto que durante el proceso de purificación se elimina casi toda la actividad MDH del extracto, para la medida de la PEPC se añadió a la mezcla de reacción 5 unidades de MDH exógena. Además, para el estudio del efecto del pH, Km, activación e inhibición, la mezcla de reacción se modificó en cuanto a los tampones empleados, concentración de sustrato, concentración de malato (inhibidor) y de glucosa-6-P (activador). Las medidas para estos estudios se realizaron a 25°C.

7.1.3. Precipitación con sulfato amónico.

El extracto se llevó al 50% de saturación con sulfato amónico. El sulfato amónico se disolvió añadiéndose lentamente al extracto colocado en baño de hielo sobre un agitador magnético. Una vez disuelto se dejó reposar 15 min centrifugándose a continuación a 30000 g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se llevó al 70% de saturación de sulfato amónico, centrifugándose igual que en el caso anterior. El precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml del mismo tampón de extracción. El extracto así obtenido se sometió a diálisis frente al tampón de extracción.

7.1.4. Cromatografía de intercambio iónico.

Tras la precipitación con sulfato amónico, el extracto se sometió a dos pasos

sucesivos de cromatografía de intercambio iónico, el primero con una columna de DEAE-sefarosa y el segundo con una de Q-sefarosa.

El extracto resultante de la precipitación con sulfato amónico, convenientemente dializado, se cargó en una columna (2,5 x 13 cm) de DEAE-sefarosa previamente equilibrada con tampón de extracción a un flujo de 40 ml h⁻¹, controlado por una bomba peristáltica Eyela MP-3 (Tokyo Rikakikai Company). Este flujo se mantuvo igual para el lavado y elución de las proteínas. Una vez comprobado que la enzima PEPC se había unido a la resina, la columna se lavó con 10 volúmenes del mismo tampón. A continuación se procedió a la elución de las proteínas por medio de un gradiente de KCl (0-0.5 M, 200 ml) disuelto en el mismo tampón, para lo cual se utilizó un formador de gradientes (GM1, Pharmacia). Con ayuda de un colector de fracciones (Redifrac 100, Pharmacia) se recogieron fracciones de 2 ml. Las fracciones con mayor actividad PEPC se reunieron y se sometieron a diálisis con objeto de eliminar el KCl.

El eluido de la columna de DEAE-sefarosa dializado se sometió a un segundo paso de cromatografía de intercambio iónico. Esta vez se utilizó una columna (1.5 x 2 cm) de Q-sefarosa que fue equilibrada con el mismo tampón a un flujo de 40 ml h⁻¹. Tras comprobar que la enzima se había adherido a la resina, se lavó la columna de igual manera que en el caso anterior.

La elución de las proteínas se llevó a cabo con el mismo formador de gradientes, pero esta vez el gradiente fue de 100 mM a 700 mM KCl. Se recogieron las fracciones del mismo modo que para la columna de DEAE y se reunieron las de mayor actividad PEPC.

7.1.5. Ultrafiltración.

El eluido de la columna de Q-sefarosa se sometió a ultrafiltración, utilizando una célula Amicon 8050, provista de una membrana Diaflo YM100 que permite el paso de moléculas de hasta 100 kDa. De este modo eliminamos proteínas de peso molecular inferior a 100 kDa, además de sales y otros compuestos, con lo que se consigue una concentración del extracto, disminuyendo su volumen unas 15 veces.

7.1.6. Cromatografía de exclusión molecular.

El extracto concentrado mediante la ultrafiltración, se sometió a una

cromatografía de exclusión molecular con el doble propósito de determinar el peso molecular nativo de la PEPC y conseguir un mayor grado de purificación. Para ello se utilizó una columna de vidrio (Biorad) de 1.5 x 70 cm (124 ml) rellena con Sephacril S-300 "Fast flow". El montaje y preparación de la columna se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor de la resina (Pharmacia Fine Chemicals). Una vez empaquetada la resina se procedió a su equilibrado con 5 volúmenes de tampón de extracción. El flujo de trabajo fue de 45 ml h⁻¹. La muestra se cargó en la columna, eluyéndose con el mismo tampón.

Para el calibrado de la columna se utilizó un kit de proteínas patrón (Sigma) para determinación de pesos moleculares por filtración. El azul dextrano (PM ≈ 2 10³ kDa) se utilizó para determinar el volumen muerto de la columna, cargándose en la columna 2.5 mg en un volumen de 1 ml. Las proteínas patrón fueron las siguientes:

Proteína	Pm (kDa)	mg/ml
anhidrasa carbónica	29	3
albúmina bovina	66	10
alcohol deshidrogenasa	150	5
β-amilasa	200	4
apoferritina	443	10
tiroglobulina	669	8

Cada proteína fue diluída en 1 ml de tampón y pasada por separado a través de la columna. El volumen de elución se calculó recogiendo fracciones de 2 ml, determinando el pico de elución de la proteína por medida de la absorbancia a 280 nm.

La calibración se llevó a cabo mediante el cálculo del volumen muerto (V₀), el volumen total de la columna (V_t) y el volumen de elución de cada muestra (V_e). Con estos datos se puede determinar la fracción del volumen estacionario del gel disponible para una especie molecular dada (K_{av}), según la siguiente expresión:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

La recta de calibrado se obtuvo representando en ordenadas el logaritmo del peso molecular de los marcadores y en abcisa sus correspondientes valores de K_{av}. Además se calculó la ecuación de la recta mediante un ajuste por mínimos cuadrados.

7.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.

La pureza de la preparación de PEPC anteriormente obtenida se verificó mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con SDS, siguiendo el sistema de Laemmli (1970). La cubeta de electroforesis utilizada fue una Midget LKB (Pharmacia) y la fuente de alimentación LKB Multi Drive XL (Pharmacia). Los geles se prepararon en placas de 10 x 8 cm con espaciadores de 1.5 mm.

Se utilizó un gel separador del 10% de acrilamida (acrilamida 29.2% - bisacrilamida 0.8%) en Tris-HCl 3 M pH 8.8, con SDS al 0.1% (p/v) y como catalizadores de la polimerización persulfato amónico (0.025%) y TEMED (0.08%). Antes de añadir los catalizadores, la solución se desgasificó al vacío en agitación durante 5 min. El gel concentrador contenía Tris-HCl 125 mM pH 6.8, acrilamida 4%, SDS 0.1%, persulfato amónico 0.05% y TEMED 0.12%. Antes de añadir los catalizadores, la solución de acrilamida fue desgasificada durante 5 min.

Las muestras fueron preparadas mezclándolas con el doble de su volumen de una solución compuesta de Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v) y β -mercaptoetanol 1.5% (v/v), para dotar a las proteínas de una carga neta negativa. Posteriormente se mantuvieron durante 3 min en ebullición para desnaturizar las proteínas.

El tampón de desarrollo estaba constituido por Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 0.192 M y SDS 0.1% (p/v). El desarrollo de la electroforesis tuvo lugar a 1 mA por carril hasta que el frente llegó al gel separador y a partir de ahí 2 mA por carril.

Para la determinación del peso molecular se han utilizado las siguientes proteínas como marcadores: anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), seroalbúmina (66 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), β -galactosidasa (116 kDa) y miosina (205 kDa). Todas las proteínas formaban parte de un kit de calibración comercial (Sigma). Los marcadores fueron disueltos en el mismo medio en que se prepararon las muestras y se procesaron de igual modo, cargando entre 5 y 10 μ g de cada marcador.

La detección de las proteínas presentes en las muestras sometidas a electroforesis se llevó a cabo por inmersión del gel en una mezcla metanol:ácido acético:agua (en proporciones 5:1:4) que contenía azul de Coomassie R-250 al 0.125% (p/v) e incubando el gel en agitación suave a temperatura ambiente durante 1-2 h. La destinción del gel se realizó mediante lavados sucesivos con la misma mezcla utilizada en la tinción, pero sin el colorante.

La movilidad relativa de cada proteína (Rf) se determinó dividiendo la distancia de migración de la proteína por la del frente. El cálculo del peso molecular se realizó por medio de las rectas de calibrado construidas representando en el eje de abcisas el Rf de las proteínas patrón y en el eje de ordenadas los logaritmos de sus pesos moleculares, calculándose la ecuación de la recta por un ajuste de mínimos cuadrados.

7.3 Caracterización de la actividad PEPC.

7.3.1. Determinación de la Km y efecto del pH.

El efecto del pH sobre la actividad PEPC fue estudiado utilizando los siguientes tampones:

Tampón	Rango de pH
MES-KOH	6.5 - 7.0
Tris-HCl	7.0 - 9.0
AMP-HCl	9.0 - 10.5

Se midió la actividad de la enzima dentro del rango de pH de 6.5 a 10.5, a intervalos de 0.5 y, en la zona proxima al óptimo, de 0.25. Las medidas se realizaron a 25 y a 30°C, obteniéndose así dos curvas de actividad frente al pH.

El efecto del pH sobre la Km de la enzima frente al sustrato, se estudió calculando la Km a cinco valores diferentes de pH: 6.5, 7.0, 7.5, 8.25 y 9.5. Para ello se construyó la curva de saturación de la enzima con el sustrato a cada un de los valores de pH mencionados, con la ayuda del programa Enzfitter (Elsevier, Biosoft).

7.3.2. Efecto del malato.

El efecto del malato como inhibidor de la actividad PEPC fue estudiado a pH 7 y a pH 8.25. Para ello se midió la actividad del enzima en presencia de concentraciones de malato crecientes, utilizandose siete concentraciones en el rango de 0 a 2 mM a pH 7.0 y diez concentraciones entre 0 y 180 mM a pH 8.25. Ambos ensayos se realizaron a 25°C. Se utilizó la misma mezcla de reacción descrita en el apartado 7.1.2. A pH 7.0 se añadió PEP 1 mM mientras que a pH 8.25 su concentración fue de 4 mM.

Para estudiar el tipo de inhibición producida por el malato y determinar el valor de la K_i , se realizaron curvas de saturación por el sustrato (PEP) a pH 7.0 en presencia de 0, 0.2, 0.4 y 0.6 mM de malato. Los resultados se representaron gráficamente por medio de la ecuación de Lineweaver-Burk.

7.3.3. Efecto de la glucosa-6-P.

La activación de la actividad PEPC por la glucosa-6-P se estudio a pH 7.0 combinando seis concentraciones de glucosa-6-P (0, 0.1, 0.5, 1, 3 y 5 mM) y tres de sustrato (PEP, 0, 1.0 y 4.0 mM). A pH 8.25 se usaron cuatro concentraciones de glucosa-6-P (0, 0.1, 1.0 y 5.0 mM) y dos concentraciones de sustrato (PEP, 0.1 mM y 4 mM) realizandose un total de ventiseis ensayos. Las mezclas de reacción utilizadas fueron similares a las descritas en el apartado anterior.

7.3.4. Estudio del efecto combinado del malato y la glucosa-6-P.

Para estudiar el efecto conjunto del malato y la glucosa-6-P, se preparó un experimento combinando tres concentraciones de glucosa-6-P (0, 0.1 y 0.4 mM) y cuatro de malato (0, 0.1, 0.4 y 1 mM) realizandose doce ensayos. Todos ellos se llevaron a cabo a pH 7.0 utilizando 1 mM de PEP. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al control sin malato ni glucosa-6-P.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS.

1. Caracterización del metabolismo carbonado y eficiencia de la fijación de nitrógeno en nódulos de *Vicia faba* a lo largo de la ontogenia del cultivo.

La evolución del crecimiento de las plantas, el proceso de fijación de nitrógeno y el estudio del metabolismo carbonado en los nódulos radicales fue llevado a cabo recogiendo las plantas cada 2-4 días. La primera toma de muestras se realizó a los 14 días de la siembra, antes de este momento los nódulos apenas son visibles, y la última a los 52 días cuando las plantas están en plena madurez y coincidiendo con el inicio de la senescencia que se manifestó con la pérdida de hojas y ennegrecimiento de raíces y nódulos.

De la visualización del cultivo se determina que el crecimiento vegetativo dura hasta el día 34 cuando se distinguen los primeros botones florales; se aprecia que existen botones florales en todas las repeticiones a los 40 días. La fructificación, que se solapa con el final de la floración, se inicia hacia el día 44 encontrándose vainas ya formadas en el día 48 del cultivo.

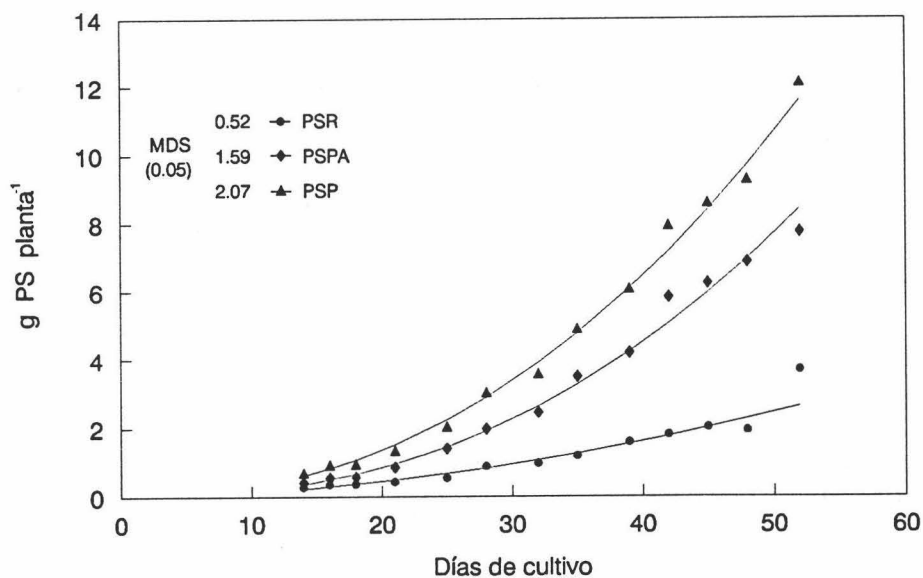


Fig. 1.1. Acumulación de materia seca, expresada en gramos por planta, en raíz (PSR), parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP), a lo largo de la ontogenia, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

1.1. Análisis del crecimiento.

Los parámetros de crecimiento determinados fueron: peso seco de raíz (PSR), parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP) expresados en g planta^{-1} , cuya evolución a lo largo del tiempo de cultivo se recoge gráficamente en la figura 1.1.

Los pesos secos de los órganos vegetativos se incrementan con el tiempo. Para el estudio de este incremento se intentó ajustar los datos de crecimiento a curvas de regresión en función del tiempo, probándose el modelo exponencial y el potencial. El mejor ajuste de los datos de crecimiento de los órganos estudiados y de la planta completa se consiguió con el modelo potencial, con el que se obtuvieron coeficientes de correlación (r) más altos que con el modelo exponencial. En la figura 1.1 se representan las curvas de regresión obtenidas de cada parámetro. Los pesos secos de parte aérea y total por planta pueden ser expresados como una ecuación potencial en función del tiempo de cultivo, con un coeficiente de correlación de $r = 0.996$.

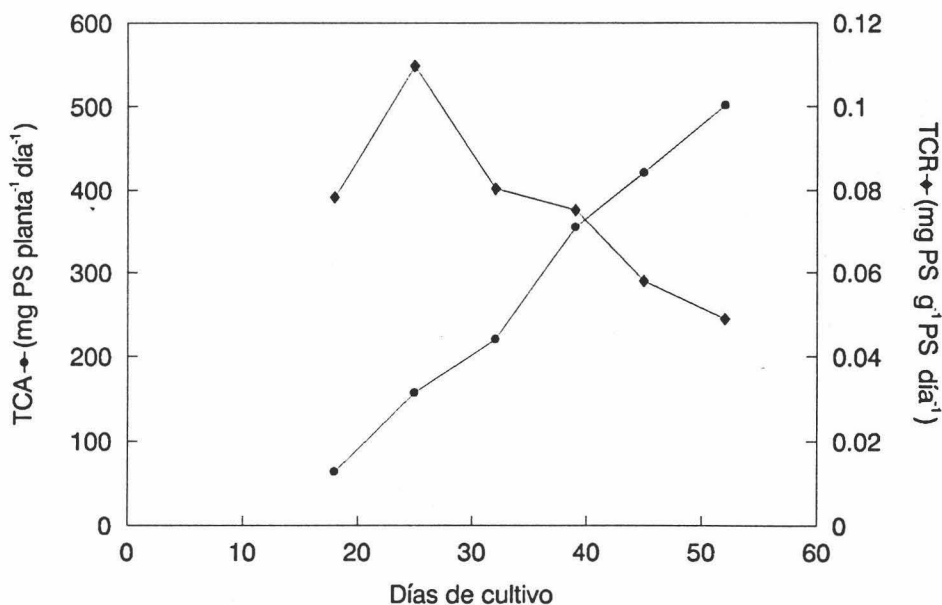


Fig. 1.2. Evolución de la tasa de crecimiento absoluto (TCA), expresada en mg de peso seco por planta por día (\bullet), y tasa de crecimiento relativo (TCR), expresada en mg de peso seco por g de peso seco por día (\blacklozenge), a lo largo de la ontogenia, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Las ecuaciones correspondientes a cada curva junto con su coeficiente de correlación (r) y porcentaje de determinación ($r^2 \times 100$) son las siguientes:

Ecuación	Coef. corr.	Nivel prob.	Determinación (%)
$PSR = e^{-6.58} t^{1.85}$	$r = 0.982$	$P \leq 0.01$	96.45%
$PSPA = e^{-7.35} t^{2.40}$	$r = 0.996$	$P \leq 0.01$	99.20%
$PSP = e^{-6.41} t^{2.24}$	$r = 0.996$	$P \leq 0.01$	99.20%

En la figura 1.2 se representan las tasas de crecimiento absoluta (TCA) y relativa (TCR). La TCA se define como el incremento de peso seco de la planta por unidad de tiempo. El cálculo se realiza tal como se describe en Material y Métodos (5.1) y se incrementa con la edad del cultivo. La tasa de crecimiento relativo se define como el incremento de peso seco del vegetal por unidad de peso seco presente y por unidad de tiempo (West *et al.* 1920). Los valores máximos de la TCR se dan entre los días 14 y 32 después de la siembra, disminuyendo a continuación hasta el final del cultivo.

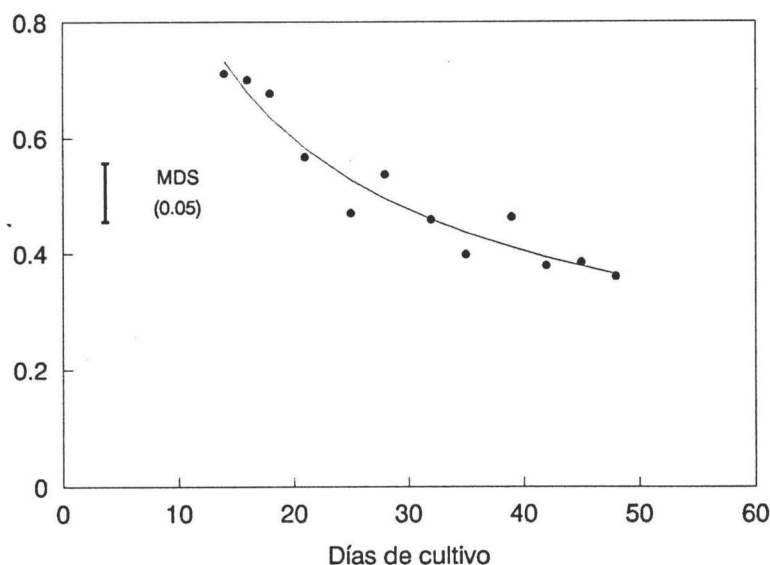


Fig. 1.3. Evolución de la relación de peso seco de raíz/parte aérea a lo largo de la ontogenia, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

La relación de peso seco de raíz/parte aérea se representa en la figura 1.3. Se observa que disminuye con el tiempo de cultivo, indicando que el crecimiento de la

parte aérea es mayor que el de la raíz. Estos valores también se ajustan a una curva de regresión de tipo potencial, cuya ecuación se expone a continuación:

$$RPA = 10^{1.18} t^{-0.56} \quad r = -0.960 \quad P \leq 0.01 \quad \text{Determinación} = 92.28 \%$$

En este caso el coeficiente de correlación presenta valor negativo porque la RPA disminuye con el tiempo. De hecho, al final del cultivo se obtienen valores del orden del 50% inferiores en relación a la primera recogida. La relación RPA presenta coeficientes de correlación negativos significativos ($P < 0.05$) con parámetros de crecimiento (PSPA y PSP) y de fijación de nitrógeno (PSN) y especialmente con ARAP ($P < 0.001$), tal como se indica en la tabla 1.5.

Una recopilación de los parámetros de crecimiento expuestos se recoge en la tabla 1.1. Los datos son media de seis repeticiones y representan al menos dos experimentos. Las mínimas diferencias significativas se han calculado al nivel de probabilidad de 0.05. Los coeficientes de correlación simple existentes entre estos parámetros se exponen en la tabla 1.5.

Tabla 1.1. Peso seco de raíz (PSR), parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP) expresados en g planta⁻¹, relación raíz/parte aérea (RPA), en plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* a lo largo de la ontogenia

Día	PSR	PSPA	PSP	RPA
14	0.27 a	0.41 a	0.69 a	0.71 a
16	0.35 a	0.55 a	0.92 a	0.70 ab
18	0.35 a	0.56 a	0.95 a	0.68 ab
21	0.42 ab	0.85 a	1.34 ab	0.57 bc
25	0.53 abc	1.40 ab	2.04 abc	0.47 cd
28	0.88 bcd	1.97 abc	3.04 bcd	0.54 c
32	0.96 cd	2.45 bc	3.59 cd	0.46 cd
35	1.18 de	3.50 cd	4.90 de	0.40 d
39	1.58 ef	4.19 d	6.08 ef	0.46 cd
42	1.80 f	5.83 e	7.94 fg	0.38 d
45	2.02 f	6.25 ef	8.61 g	0.39 d
48	1.93 f	6.86 ef	9.28 g	0.36 d
52	3.69 g	7.75 f	12.12 h	0.58 abc
MDS (0.05)	0.52	1.59	2.07	0.13

*a-h: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

1.2. Fijación de nitrógeno.

El proceso de fijación de nitrógeno está representado en diferentes parámetros: peso seco de nódulos (PSN) expresado en g planta^{-1} y peso normalizado de nódulos (PNN) en mg g^{-1} PA (figuras 1.4 y 1.5 respectivamente), actividad nitrogenasa, determinada por la actividad reductora de acetileno específica (ARA), expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, y total por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 1.6); producción de hidrógeno (H) en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$ y eficiencia relativa (ER) (Fig. 1.7).

El peso seco de nódulos (Fig 1.4) incrementó en cada una de las determinaciones realizadas, obteniéndose una curva de regresión de tipo potencial cuya ecuación es la siguiente:

$$\text{PSN} = e^{-10.97} t^{2.66} \quad r = 0.987 \quad P \leq 0.01 \quad \text{Determinación} = 97.33 \%$$

Los nódulos empezaron a ser visibles a los 10 días después de la inoculación, pero fueron aislables hasta cuatro días después, momento en que se realizó la primera toma de muestras. La masa nodular experimentó un crecimiento constante durante el desarrollo vegetativo. Es a partir del día 18 (máximo de actividad nitrogenasa) cuando el crecimiento de los nódulos resultó fuertemente estimulado ($P \leq 0.05$) encontrándose incrementos del 50 % entre medidas. Este parámetro presenta una correlación positiva significativa con PSR, PSPA, PSP y negativa con la ARA y la producción de hidrógeno (Tabla 1.5).

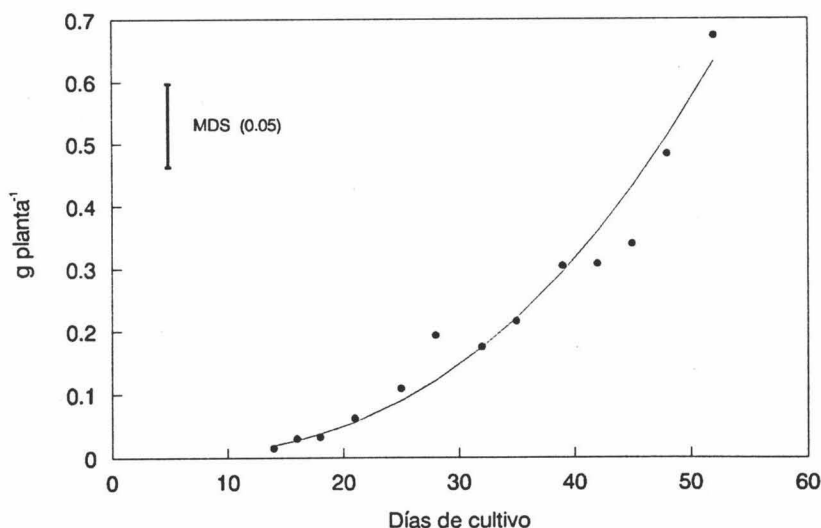


Fig. 1.4. Acumulación de peso seco de nódulos, expresado en g planta^{-1} , a lo largo de la ontogenia en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

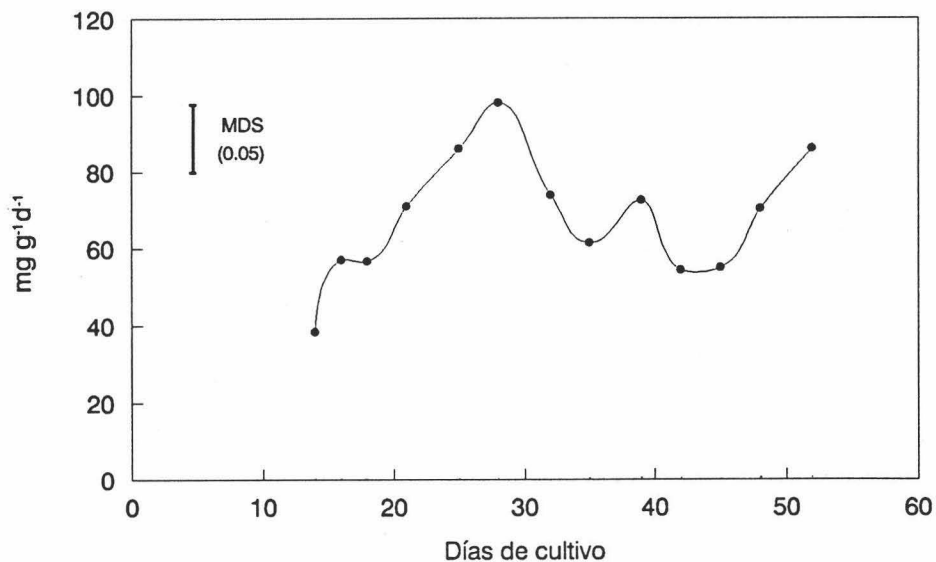


Fig. 1.5. Evolución del peso normalizado de nódulos, expresado en mg PSN g⁻¹ PSPA, a lo largo de la ontogenia, en plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

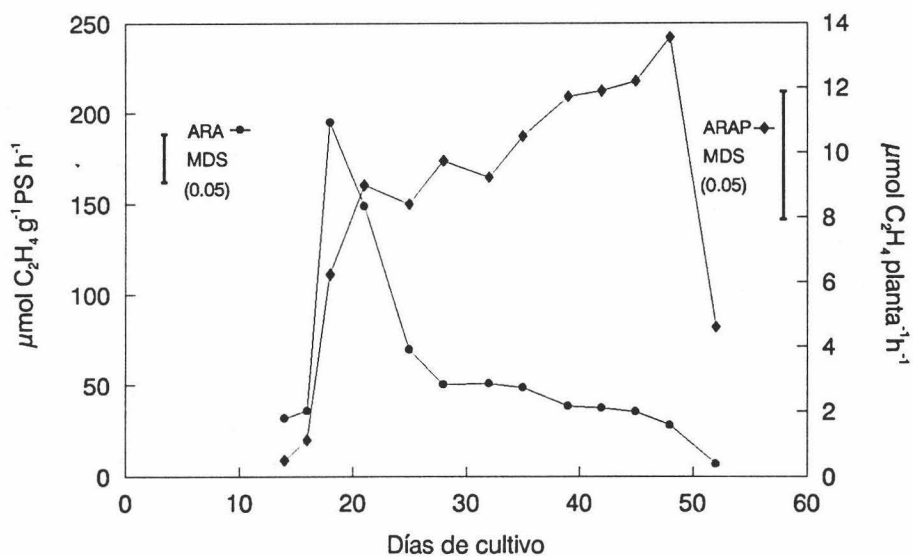


Fig. 1.6. Evolución de la actividad reductora de acetileno específica (ARA), expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, y actividad reductora de acetileno total por planta (ARAP) expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Por otra parte, el peso normalizado de los nódulos (Fig. 1.5) que relaciona la masa nodular con el desarrollo de la parte aérea, aumenta durante los primeros días de cultivo y alcanza el máximo el día 28. Posteriormente se observan dos picos, uno coincidiendo con el pleno desarrollo de la floración (día 39) y otro con los últimos muestreos realizados, en fructificación.

La evolución de la ARA (Fig. 1.6) determina que a los 18 días de cultivo se alcanza un máximo de $198 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$ tras un brusco incremento desde el inicio. Después de un fuerte descenso hasta el día 28, disminuye de forma gradual distinguiéndose dos zonas o mesetas de estabilidad en las que la actividad específica se mantienen después de un descenso suave. La primera meseta se establece entre los días 28 y 35 de cultivo y la segunda entre los días 42-48.

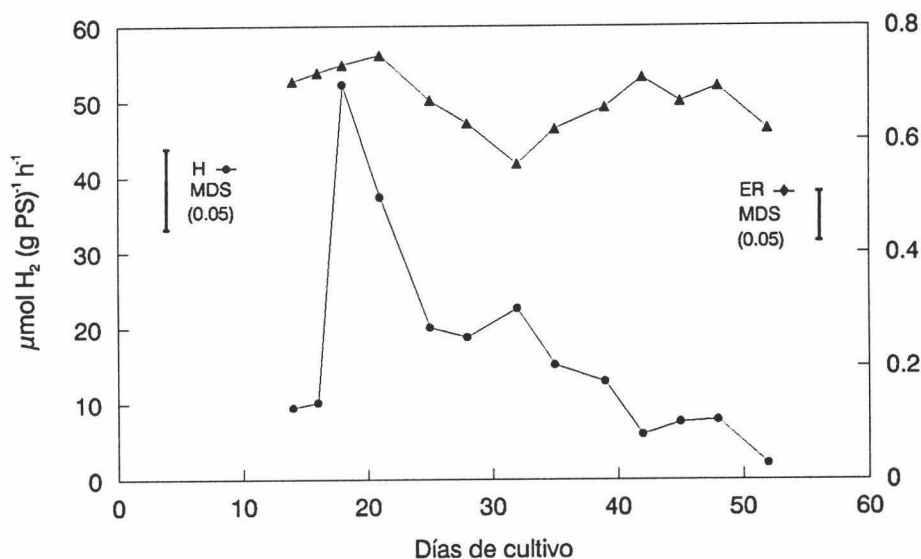


Fig. 1.7. Evolución de la producción de hidrógeno por la nitrogenasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PSN h}^{-1}$, y eficiencia relativa a lo largo de la ontogenia, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Cuando se observa la evolución de ARAP (Fig. 1.6) se distinguen tres etapas bien diferenciadas. Una primera relacionada con el pico espectacular de ARA específica a los 18 días. A continuación la segunda etapa se caracteriza por un aumento progresivo de la actividad y dura hasta el día 48 de cultivo, momento en que se obtiene la máxima actividad, para disminuir drásticamente en la tercera etapa coincidiendo con la senescencia de la planta, encontrándose diferencias significativa

entre ellas ($P < 0.05$).

La producción de hidrógeno (Fig. 1.7) fue determinada por cromatografía gaseosa y sirvió para calcular la eficiencia relativa (ER). La evolución de la producción de hidrógeno a lo largo del cultivo es muy similar a la evolución de ARA, con un máximo muy pronunciado a los 18 días. De hecho esta similitud se refleja en una muy alta correlación entre la producción de hidrógeno y ARA ($P < 0.001$, Tab. 1.5). La eficiencia relativa mostró los valores más altos, cercanos a 0.75, durante las cuatro primeras recogidas, disminuyendo entre los días 25 y 35 hasta valores de algo más de 0.5. Se recupera durante el periodo reproductor y baja en el último muestreo.

La evolución del contenido total de nitrógeno reducido por planta se presenta en la figura 1.8. Este contenido va aumentando a lo largo de la ontogenia, siguiendo una evolución parecida a la acumulación de materia seca (Fig. 1.1).

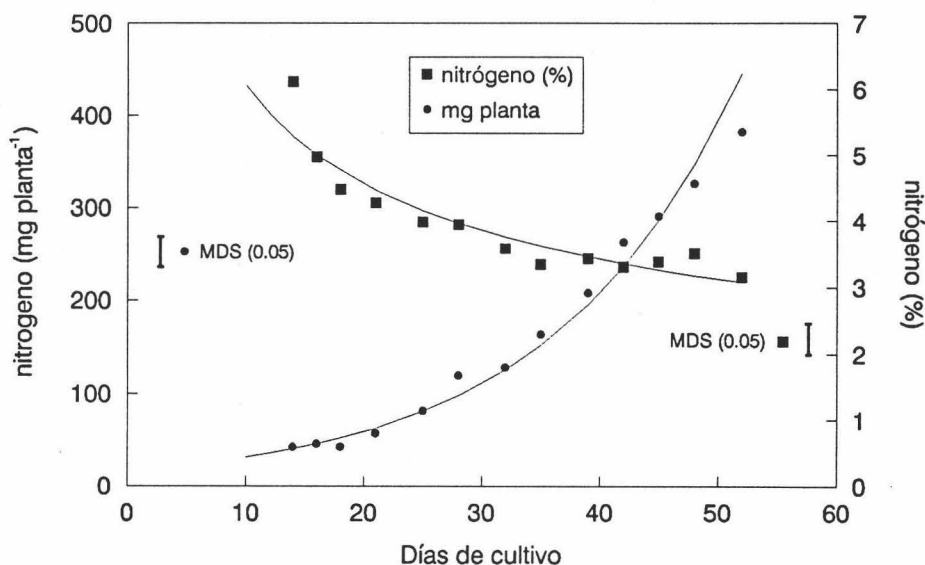


Fig. 1.8. Evolución del contenido en nitrógeno reducido, expresado en miligramos de nitrógeno por planta (●) y en tanto por ciento de peso seco (■), a lo largo de la ontogenia, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Los datos se ajustan a una curva de tipo exponencial, con la siguiente ecuación:

$$N = 16.67 e^{0.063t} \quad r = 0.991 \quad P \leq 0.01 \quad \text{Determinación} = 98.2 \%$$

Este parámetro se correlaciona positivamente con el peso seco de los diferentes órganos y de la planta completa con unos coeficientes superiores a 0.96 (Tab. 1.5). En cambio se correlaciona negativamente con RPA, producción de hidrógeno y ARA. También tiene una buena correlación positiva con la actividad MDH y negativa con la actividades PEPC y SS.

Sin embargo, el contenido de N expresado como porcentaje de peso seco va disminuyendo a lo largo de la ontogenia (fig. 1.8). Estos datos se ajustan a una curva de tipo potencial en función del tiempo, cuya ecuación es:

$$N (\%) = e^{2.75} t^{-0.41} \quad r = -0.94 \quad P \leq 0.01 \quad \text{Determinación} = 88.6 \%$$

Es lógico, por tanto, que el porcentaje de nitrógeno presente unas correlaciones contrarias al contenido total de nitrógeno por planta, es decir, negativas con los parámetros de acumulación de peso seco, ARAP y SS, y negativa con MDH.

Una tabla de recopilación de los datos relacionados con la eficiencia de la fijación de nitrógeno, incluyendo N total por planta, se ha elaborado (Tabla 1.2). Los datos son media de seis repeticiones y representan al menos dos experimentos.

Tabla 1.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹; peso normalizado de nódulos (PNN) en mg g⁻¹; producción de hidrógeno por la nitrogenasa (H) expresado en $\mu\text{mol H}_2$ (g PS)⁻¹ h⁻¹; actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (g PS)⁻¹ h⁻¹; actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ planta⁻¹ h⁻¹; eficiencia relativa (ER); contenido de nitrógeno reducido (N) en mg planta⁻¹.

Día	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	N
14	0.016 a	35 a	9.0 abc	31.9 bc	0.50 a	0.70 bcd	42a
16	0.031 a	54 bc	10.1 abc	35.9 bc	1.12 ab	0.72 bcd	46a
18	0.032 a	56 bcd	52.3 g	195.1 f	6.23 bcd	0.73 cd	42a
21	0.060 ab	72 def	37.4 f	148.9 e	8.99 cde	0.75 d	57ab
25	0.120 abc	78 ef	20.1 de	69.6 d	8.40 cde	0.67 bc	81b
28	0.193 bcd	97 g	18.8 de	50.5 cd	9.75 cde	0.63 abc	120c
32	0.181 bcd	71 cdef	22.6 de	51.1 cd	9.23 cde	0.56 a	129d
35	0.215 cde	62 bcde	15.2 cde	48.8 bcd	10.50 de	0.62 ab	164e
39	0.304 de	76 e	13.0 abcd	38.6 bc	11.73 de	0.66 abcd	208f
42	0.317 de	53 b	5.9 ab	37.6 bc	11.90 de	0.71 bcd	263g
45	0.344 ef	58 bcd	7.6 abc	35.5 bc	12.21 e	0.67 bcd	291h
48	0.482 f	67 bcdef	7.8 abc	28.1 ab	13.55 e	0.69 bcd	326i
52	0.667 g	83 fg	2.08 a	6.9 a	4.61 abc	0.62 ab	382j
MDS (0.05)	0.142	17	8.5	21.7	5.75	0.10	25

*a-h: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

1.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.

Los cambios de las actividades sacarosa sintasa e invertasa alcalina, ambas expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, durante el desarrollo ontogénico, se han representado en la fig 1.9. El máximo de actividad sintasa se detecta entre los días 18 y 25. Esta enzima presenta un mínimo de actividad hacia el día 32 seguido de una pequeña recuperación, manteniéndose con una disminución leve y gradual hasta el final del cultivo. Se pueden establecer tres etapas, de forma semejante a las que se establecieron en algunos parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, no en vano existe una correlación positiva significativa (Tabla 1.5) con ARA y con la producción de H por la nitrogenasa ($P < 0.01$) y negativa con el PSN.

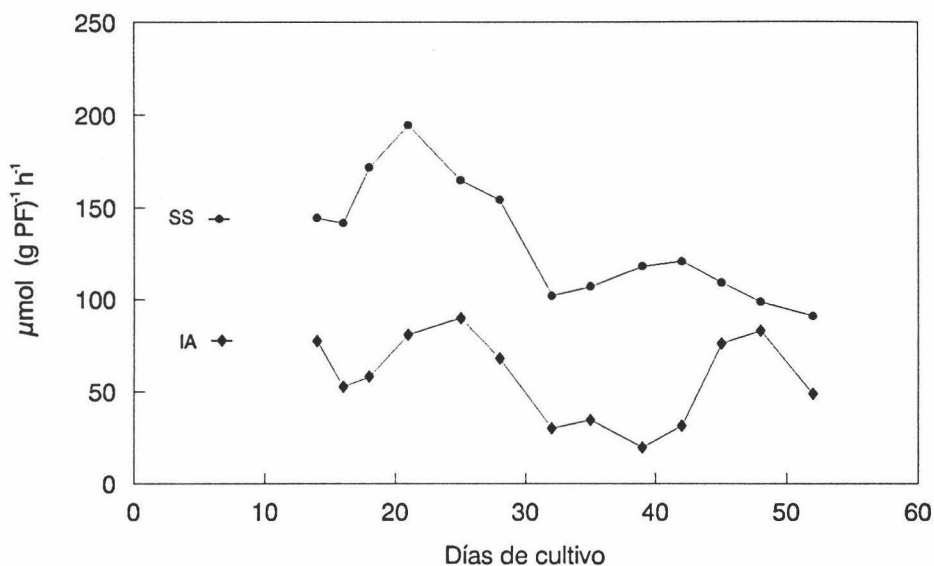


Fig. 1.9. Evolución de las actividades sacarosa sintasa (SS) e invertasa alcalina (IA) expresadas en micromoles de sustrato hidrolizado por gramo de peso fresco por hora, del citosol nodular a lo largo de la ontogenia en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) SS, 9; IA, 5.

La invertasa alcalina sigue una evolución similar (Fig. 1.9), presentando los valores máximos desplazados en el tiempo respecto a la SS. Durante el crecimiento vegetativo los valores de esta actividad enzimática fueron entre un 50 y un 70% inferiores a los de la SS. Al inicio del periodo reproductor la IA presenta un mínimo,

con valores entre 25-30 % de la actividad SS, seguido de una fuerte recuperación, alcanzando valores similares a los del periodo vegetativo, que suponen en estos momentos casi el 80% de la SS. Por tanto, en este periodo la actividad IA puede ser una vía de hidrólisis de la sacarosa de la misma importancia que la vía de la sintasa y así compensar en parte la caída de esta última actividad ya que en este periodo no recupera el nivel del periodo vegetativo. En la tabla 1.5 se puede comprobar que la IA no presenta correlación significativa con ninguno de los parámetros determinados en este experimento.

La evolución de las actividades de la ruta de las pentosas fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa presentes en la fracción vegetal del nódulo, se exponen en la figura 1.10.

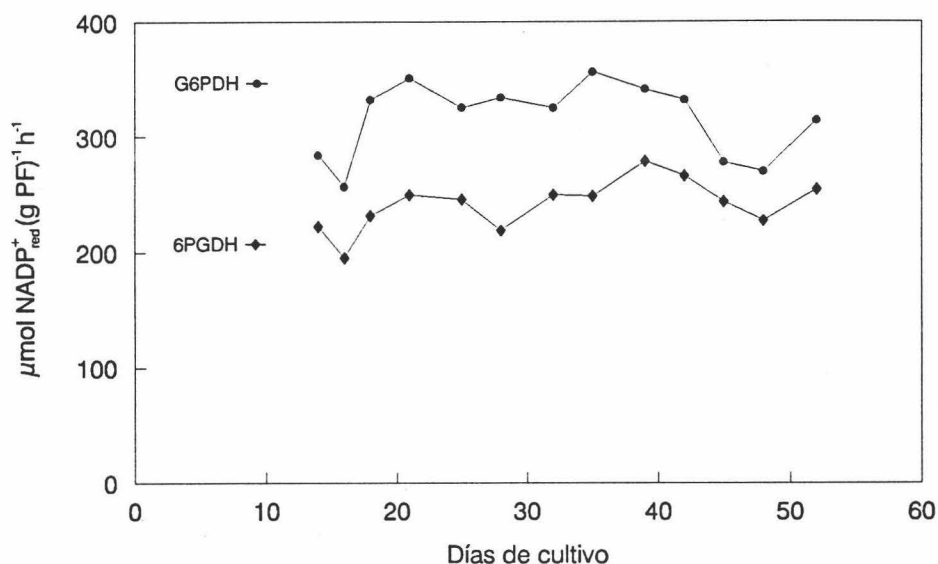


Fig. 1.10. Evolución de las actividades glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) y 6-P-gluconato deshidrogenasa (6PGDH) expresadas en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}}^{+} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, del citosol nodular a lo largo de la ontogenia en plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) G6PDH, 20; 6PGDH, 26.

Los valores más altos de la G6PDH se detectaron durante el periodo de crecimiento vegetativo y durante periodo reproductor, coincidiendo con los máximos valores de otras actividades enzimáticas, concretamente con el máximo descrito para la sintasa y para la invertasa en dicho periodo (Fig. 1.9). De hecho el primer máximo se detecta entre los 18 y 25 días (época de máxima tasa de crecimiento relativa) y el

segundo coincidiendo con la floración. Entre ambos máximos hay una zona de valores más bajos que coincide con el cambio de periodo vegetativo a reproductor. Se presenta un mínimo alrededor del día 30 y la actividad se recupera durante la fase reproductora. La senescencia del cultivo viene acompañada por una disminución de esta actividad.

El comportamiento que se puede describir para la actividad 6PGDH es bastante similar. Ambas actividades constituyen el paso inicial de la vía de las pentosas fosfato. Durante todo el crecimiento vegetativo la diferencia entre ambas actividades se sitúa entre el 25-35%. Sin embargo, a partir del día 39 de cultivo (periodo reproductor) el porcentaje de diferencia disminuye y se sitúa entre el 15-20%. Ambas actividades enzimáticas se mantienen, con algunos cambios no significativos estadísticamente, durante el crecimiento reproductor y presentan un nivel de correlación entre sí positivo y significativo (Tabla 1.5).

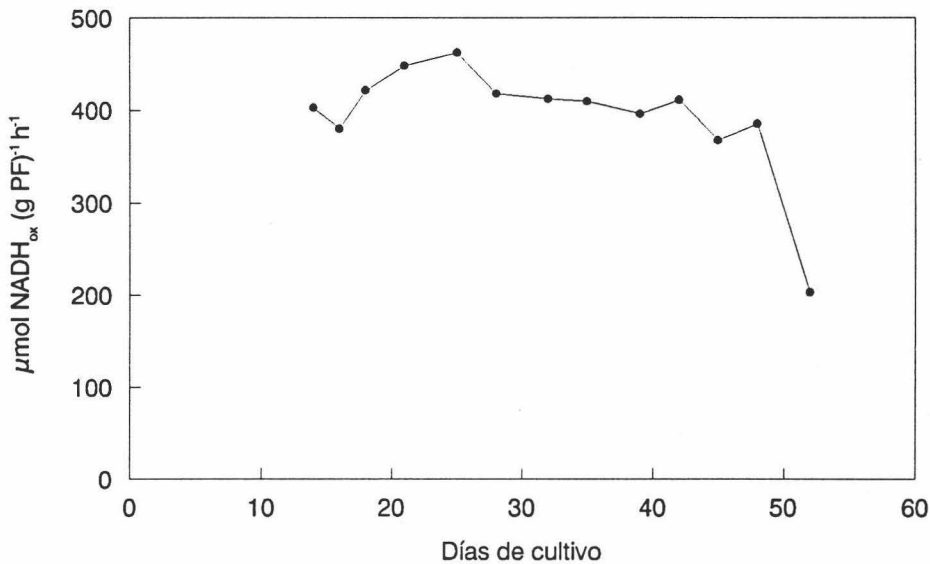


Fig. 1.11. Evolución de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, expresada en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, a lo largo de la ontogenia, en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.MDS ($P \leq 0.05$) 25.

Como se observa en la figura 1.11 la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa del citosol nodular mostró un máximo a los 25 días de cultivo, en el crecimiento vegetativo, constituyendo los niveles más altos de actividad que se detectaron durante toda la ontogenia. Después se mantiene la actividad durante el periodo de floración, entre los días 28 y 34 con niveles de actividad bastante semejantes hasta fructificación,

observándose una drástica caída con el llenado de la vaina y la senescencia de los nódulos. Se detectó una alta correlación negativa significativa con los parámetros de crecimiento y positiva con la actividad sacarosa sintasa (Tabla 1.5). En cambio no se detectó correlación significativa de la actividad PEPC con los parámetros de fijación de nitrógeno.

La actividad MDH (Fig 1.12) durante el crecimiento vegetativo e inicio de la floración (hasta el día 32 de cultivo) presenta valores entre 5 y 7 veces superiores a la actividad PEPC y en floración y fructificación alcanza valores entre 8 y 10 veces mayores que dicha actividad. Los valores van aumentando suavemente desde el inicio del cultivo hasta el día 25 que presenta un máximo. Hay un mínimo sobre los 30 días y después un aumento importante durante el periodo reproductor. Este incremento es bastante similar al que se aprecia en la actividad ICDH (Fig 1.13) e independiente de la proteína nodular y constituye un 20% más de actividad en la etapa de madurez del cultivo. La MDH, al contrario que la PEPC, presenta una alta correlación positiva con los parámetros de crecimiento (PSR, PSPA y PSP) y con el ARAP (Tab. 1.5) así como con G6PDH y con ICDH ($P \leq 0.001$).

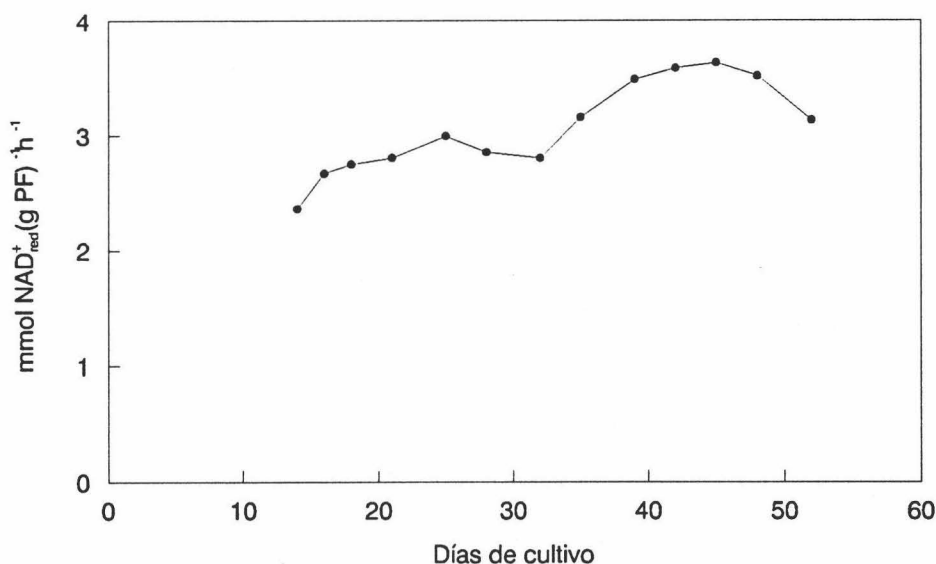


Fig. 1.12. Evolución de la actividad malato deshidrogenasa, expresada en $\text{mmol NAD}^+_{\text{red}} \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, a lo largo de la ontogenia, en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) 0.121.

La actividad ICDH (Fig. 1.13) presenta un perfil parecido al de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato (Fig. 1.10) con un descenso al final del periodo vegetativo y una recuperación durante el periodo reproductor. Esta actividad muestra un nivel de correlación positivo y significativo (Tab. 1.5) con la 6PGDH y la MDH, así como con los parámetros de crecimiento (PSR, PSPA, PSP) y fijación de nitrógeno (PSN, ARAP) y negativo con RPA.

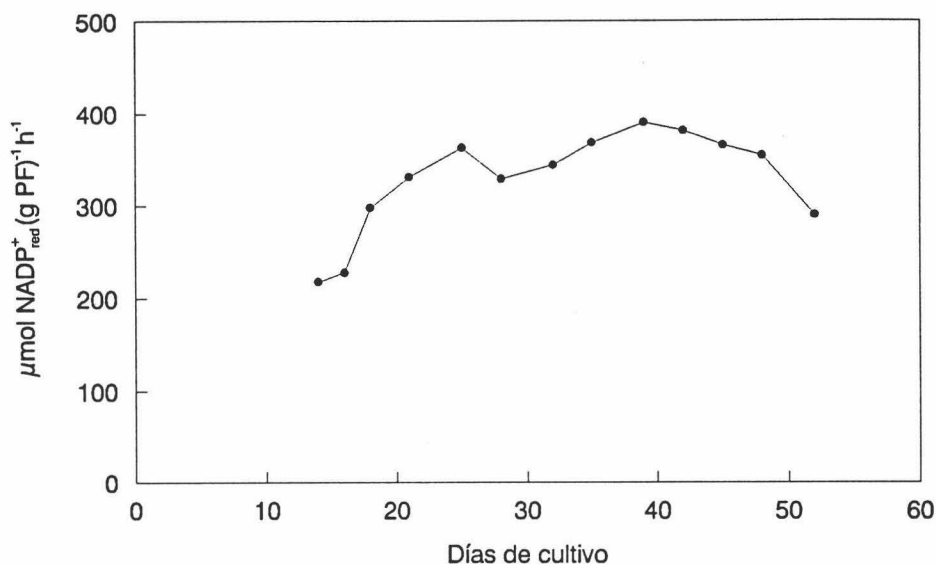


Fig. 1.13. Evolución de la actividad isocitrato deshidrogenasa, expresada en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}}^{+} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, a lo largo de la ontogenia en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA 19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) 24.

En general, las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado estudiadas en el citosol nodular presentan sus máximos valores durante el crecimiento vegetativo, coincidiendo con los valores más altos de la tasa de crecimiento relativo. En algunos casos, tras la caída de la actividad al final del periodo vegetativo, hubo un incremento de la actividad durante el periodo reproductor. Al inicio del desarrollo de los órganos reproductores, con la aparición de los botones florales, parecen producirse una serie de cambios que llevan a una depresión del metabolismo carbonado, seguida de una recuperación durante el crecimiento reproductor y una caída final con la senescencia.

El contenido en proteína soluble (Fig. 1.14) presenta valores que oscilan entre los 11 y los 15 mg por g de peso fresco de nódulos, salvo en la última recogida en que el contenido de proteína disminuye hasta 8,3. Este parámetro presenta variaciones a lo largo del cultivo, con una tendencia a disminuir. Sin embargo al final del crecimiento vegetativo presenta un incremento que coincide con el descenso en las actividades del metabolismo carbonado. Este aumento de proteína hace que si se expresan estas actividades por mg de proteína (Tab. 1.4) el descenso mencionado, al final del periodo vegetativo y la posterior recuperación, sean aun más patentes.

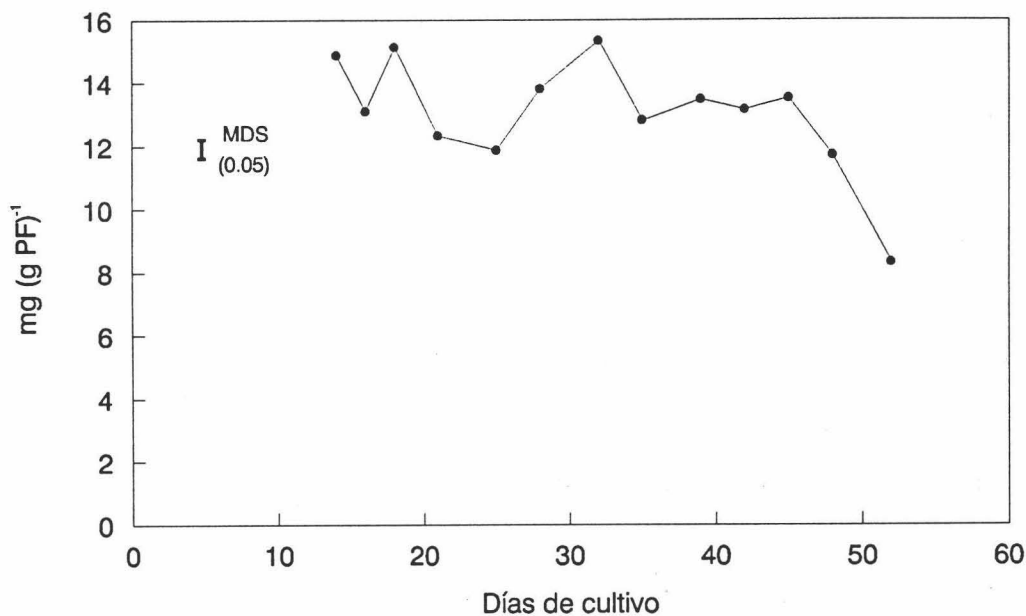


Fig. 1.14. Evolución del contenido de proteínas solubles a lo largo de la ontogenia, en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

A continuación se exponen dos tablas en las que se recopilan todas las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado del citosol nodular determinadas expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en la tabla 1.3 y en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$ (tabla 1.4). Los datos son media de cuatro repeticiones y proceden de al menos dos experimentos.

Tabla 1.3. Actividad de las enzimas del metabolismo carbonado expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} , en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* a lo largo de la ontogenia. SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble.

Día	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
14	144f	77f	284b	223bc	403cd	2359a	218a	14.9g
16	142f	53cd	257a	195a	380bc	2669b	228a	13.1de
18	172h	58d	332cd	232bcde	421d	2750bc	298b	15.2g
21	195i	81fg	351ef	250def	448e	2806c	331cd	12.3bc
25	165h	90h	326d	246cdef	462e	2996d	363ef	11.9b
28	154g	68e	334cde	219ab	418d	2855c	329c	13.8f
32	102bc	30b	325cd	250def	412d	2804c	344cde	15.4g
35	107bc	35b	357f	249cdef	409d	3160e	368efg	12.8cd
39	118de	20a	342def	279g	396cd	3491f	390g	13.5ef
42	121e	31b	332cd	266fg	411d	3588f	381fg	13.2def
45	109cd	76f	278b	244cdef	368b	3635g	365ef	13.5ef
48	99ab	83g	270ab	227bcd	385bc	3521f	355de	11.7b
52	91a	49c	314c	254efg	203a	3134e	290b	8.3a
MDS (0.05)	9	5	20	26	25	121	24	0.6

Tabla 1.4. Actividad de las enzimas del metabolismo carbonado expresadas en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} , en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* a lo largo de la ontogenia. Las abreviaturas utilizadas son las mismas que en la tabla anterior.

Día	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH
14	161 e	86 f	318 a	249 a	450 bc	2639 a	218 a
16	180 f	67 e	327 a	248 a	483 cde	3396 c	228 a
18	188 f	64 e	364 c	254 ab	462 bcd	3016 b	298 b
21	264 h	110 h	476 h	339 d	607 h	3802 d	331 c
25	231 g	126 j	456 g	344 e	648 i	4196 ef	363 def
28	186 f	82 f	403 e	265 a	504 ef	3448 c	329 c
32	110 a	33 b	352 b	270 b	446 b	3034 b	344 cd
35	139 bc	45 d	464 gh	324 d	533 fg	4115 e	368 efg
39	146 cd	24 a	422 f	344 e	489 d	4310 f	390 g
42	152 de	40 c	419 f	336 d	519 efg	4531 g	381 fg
45	134 b	94 g	343 b	301 c	454 bc	4487 g	365 de
48	140 bc	118 c	384 d	324 d	549 g	5016 h	355 de
52	182 f	98 g	631 i	510 f	407 a	6293 i	290 b
MDS (0.05)	9	4	14	17	33	170	22

*a-h: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

Tabla 1.5. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular, en plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco por planta; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; H, producción de hidrógeno en aire; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; ER, eficiencia relativa; RPA, relación raíz/parte aérea; SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; N (%) contenido de nitrógeno (en porcentaje); N (pl) contenido de nitrógeno total por planta (en mg planta⁻¹).

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT	N (%)	N(pl)
PSR	1.000																			
PSPA	0.941	1.000																		
PSP	0.970	0.995	1.000																	
RPA	-0.438	-0.658	-0.603	1.000																
PSN	0.977	0.957	0.977	-0.526	1.000															
PNN	0.268	0.153	0.195	-0.210	0.344	1.000														
H	-0.591	-0.626	-0.622	0.352	-0.597	0.029	1.000													
ARA	-0.544	-0.561	-0.563	0.344	-0.564	-0.075	0.972	1.000												
ARAP	0.310	0.530	0.474	-0.910	0.406	0.288	-0.044	-0.035	1.000											
ER	-0.374	-0.299	-0.327	0.363	-0.390	-0.467	0.306	0.487	-0.201	1.000										
SS	-0.745	-0.788	-0.785	0.528	-0.758	0.012	0.712	0.753	-0.283	0.629	1.000									
IA	-0.250	-0.204	-0.218	0.173	-0.184	0.060	0.140	0.203	-0.127	0.418	0.471	1.000								
G6PDH	-0.071	-0.137	-0.118	-0.193	-0.090	0.359	0.462	0.421	0.340	-0.207	0.261	-0.378	1.000							
6PGDH	0.443	0.450	0.452	-0.553	0.410	0.143	-0.053	-0.029	0.555	-0.248	-0.262	-0.479	0.635	1.000						
PEPC	-0.833	-0.644	-0.707	-0.093	-0.759	-0.137	0.514	0.488	0.234	0.296	0.610	0.201	0.280	-0.071	1.000					
MDH	0.656	0.830	0.788	-0.843	0.691	0.101	-0.425	-0.341	0.809	-0.100	-0.551	-0.230	0.031	0.569	-0.194	1.000				
ICDH	0.732	0.816	0.801	-0.859	0.748	0.332	-0.357	-0.352	0.800	-0.500	-0.653	-0.399	0.300	0.679	-0.297	0.876	1.000			
PRT	-0.704	-0.584	-0.629	0.164	-0.711	-0.445	0.430	0.348	-0.031	0.053	0.278	-0.144	0.040	-0.183	0.663	-0.330	-0.347	1.000		
N (%)	-0.698	-0.753	-0.747	0.803	-0.726	-0.548	0.225	0.229	-0.778	0.475	0.554	0.391	-0.358	-0.630	0.288	-0.810	-0.819	0.430	1.000	
N (pl)	0.956	0.990	0.990	-0.621	0.974	0.231	-0.631	-0.574	0.497	-0.317	-0.786	-0.187	-0.149	0.429	-0.682	0.800	0.434	-0.612	-0.738	1.000

Valor crítico
P_≤ 0.05 0.01 0.001
0.553 0.684 0.801

2. Estudio del efecto de la cepa de *Rhizobium* utilizada como microsimbionte en la utilización del carbono por el nódulo.

En este experimento se utilizaron doce cepas diferentes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en la inoculación de plantas de *Vicia faba* cv. Alborea a fin de estudiar su efecto sobre la fijación de nitrógeno y metabolismo carbonado en los nódulos. Las cepas utilizadas pertenecen a una colección propia, su aislamiento y procedencia se exponen en el apartado de Material y Métodos (1.2).

Los cultivos se llevaron hasta el inicio del periodo reproductor ya que se considera como el periodo en que la simbiosis alcanza su máxima expresión y por tanto un crecimiento adecuado para llevar a cabo estudios comparativos de fijación de nitrógeno y otros aspectos metabólicos de la simbiosis. Todos los datos obtenidos proceden siempre de plantas con igual desarrollo fisiológico, al realizar la toma de muestras al inicio de la floración que no varió en este tipo de experimentos. El sistema de cultivo empleado permitió un desarrollo adecuado de la planta, por lo que en el momento de la recolección no han aparecido las limitaciones propias del sistema.

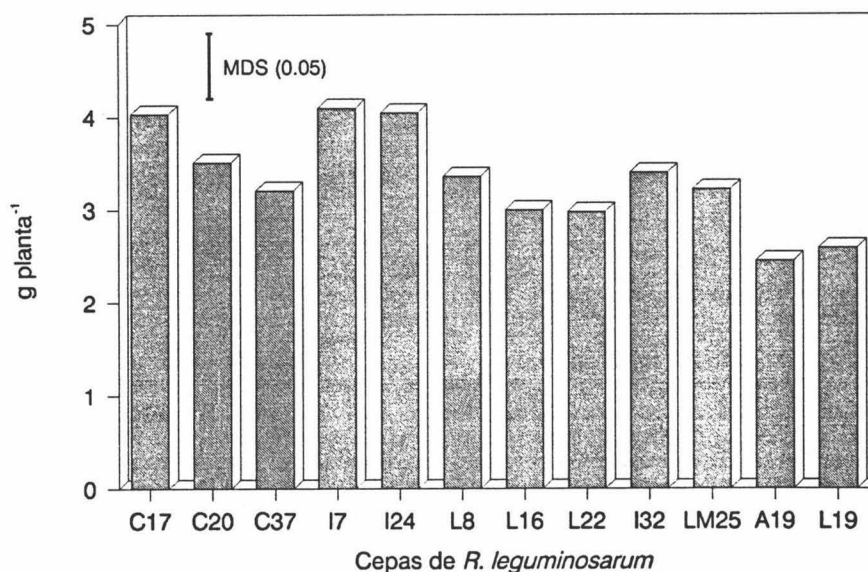


Fig. 2.1. Peso seco de parte aérea (PSPA), expresado en gramos por planta, de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

2.1. Análisis del crecimiento.

En el diagrama de barras de la figura 2.1 se muestra el peso seco de la parte aérea que osciló entre 2.45 y 4.10 g planta⁻¹. Esto implica que el valor más bajo es el 60% del máximo crecimiento de este órgano vegetal. En este caso destacan las cepas GRC17, GRI24 y GRI7 con los valores más altos y las cepas GRA19, GRL19 y GRL22 con los menores.

El peso seco de raíz (Fig. 2.2) osciló entre 0.95 y 1.45 g, lo que supone que el mínimo constituye el 65% del valor más alto. Los datos encontrados indican que solo existen diferencias significativas en pocas cepas. Destacan las cepas GRL8, GRC17, GRI7 y GRI24 entre las que obtuvieron un PSR más alto y GRL16, GRA19 y GRLM25 con los valores más bajos.

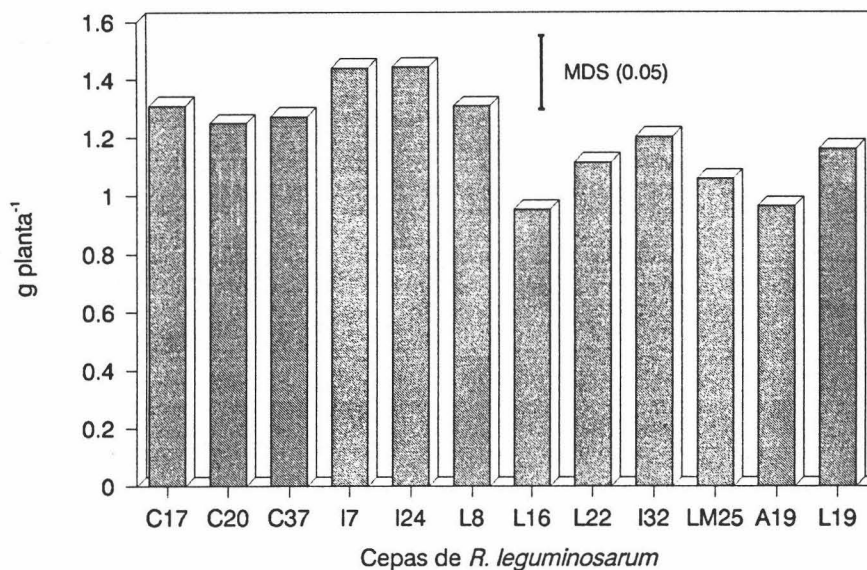


Fig. 2.2. Peso seco de raíz (PSR) en g planta⁻¹, de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

El peso seco total por planta (Fig. 2.3) muestra pocas diferencias significativas, destacando con los máximos y mínimos valores las mismas cepas descritas anteriormente.

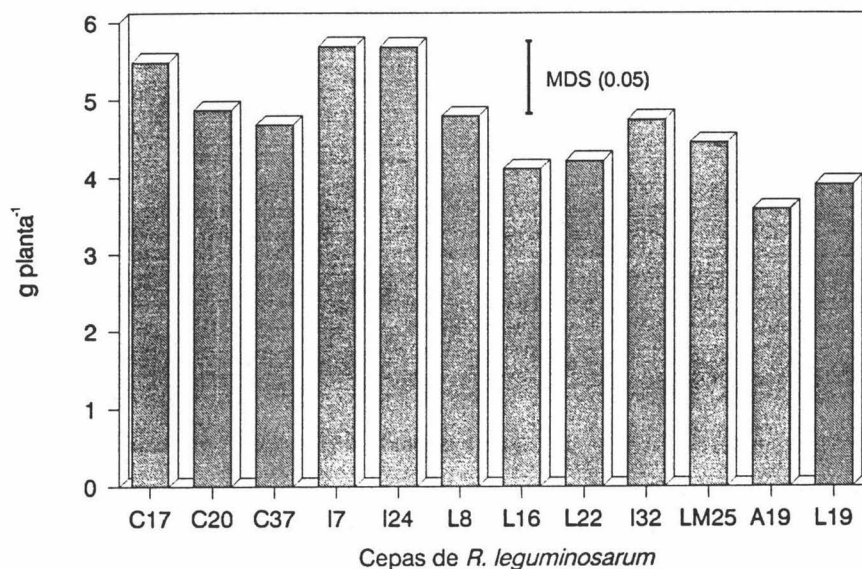


Fig. 2.3. Peso seco de planta completa (PSP), expresado en g planta^{-1} , de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Existe un alto coeficiente de correlación entre los pesos secos de raíz, parte aérea y planta completa (Tabla 2.7), siendo el más alto entre parte aérea y planta completa, dado que la parte aérea constituye del orden del 70% del peso seco total de la planta. Es por esto que en los tres parámetros descritos coinciden las plantas que destacan por valores máximos o mínimos.

La inoculación bacteriana provoca la posibilidad de establecer tres tipos de comportamiento entre ellas: aquellas que inducen el máximo crecimiento de las plantas (GRI24, GRI7 y GRC17); las que producen un crecimiento en la planta que representa algo más del 60% del crecimiento que se alcanza en el grupo anterior (GRA19, GRL19, GRL22 y GRL16) y por último se establece un tercer grupo que producen un crecimiento intermedio que oscila entre el 80-90% del máximo, en el cual se encuentran el resto de cepas de *Rhizobium* estudiadas.

Por lo que se refiere a la relación de peso seco de raíz/parte aérea la variabilidad encontrada fue muy patente. En los resultados obtenidos se encuentran datos tan distintos como 0.51 para GRL19 y 0.36 para GRC17. En general se podría establecer que una RPA alta implica un desequilibrio en el crecimiento de ambos órganos vegetativos que conducen a inóculos o cepas menos productivos que aquellos

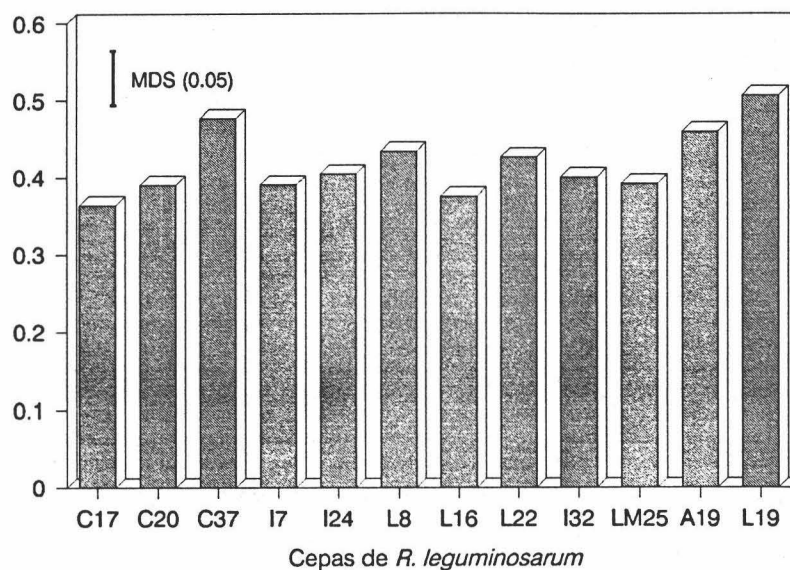


Fig. 2.4. Relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Tabla 2.1. Pesos secos, expresados en g planta⁻¹, de raíz (PSR), parte aérea (PSPA), planta completa (PSP) y relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA).

CEPA	PSR	PSPA	PSP	RPA
C17	1.31 bc	4.03 d	5.49 cd	0.36 a
C20	1.25 abc	3.51 cd	4.87 bc	0.39 ab
C37	1.27 abc	3.20 abcd	4.68 abcd	0.48 cd
I7	1.44 c	4.10 d	5.68 d	0.39 ab
I24	1.45 c	4.04 d	5.67 d	0.40 abc
L8	1.31 bc	3.36 abcd	4.79 abc	0.43 abcd
L16	0.95 a	3.00 abc	4.11 ab	0.37 a
L22	1.12 abc	2.98 abc	4.21 ab	0.43 abcd
I32	1.20 abc	3.39 bcd	4.74 abc	0.40 abc
LM25	1.06 ab	3.22 abcd	4.45 abc	0.39 ab
A19	0.96 ab	2.45 a	3.59 a	0.46 bcd
L19	1.16 abc	2.59 ab	3.90 ab	0.51 d
MDS (0.05)	0.35	0.91	1.20	0.08

*a-d: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

que producen una RPA menor. También hay que destacar un coeficiente de correlación negativo significativo con el PSPA y por tanto con el PSP. Además, se observa una correlación significativa con algunos parámetros de la fijación de nitrógeno, negativa con la ER y positiva con el PNN (Tabla 2.7).

Los resultados de peso seco de raíz, parte aérea, planta entera así como la relación de peso seco de raíz/parte aérea se exponen en la tabla 2.1 a modo de resumen. Se ha de hacer constar que cada dato es media de seis repeticiones y cada cepa se ha estudiado al menos en dos experimentos. Los datos se han tratado con el procedimiento estadístico habitual.

2.2. Fijación de nitrógeno.

Los datos de los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno se exponen en la tabla 2.2. junto con las mínimas diferencias significativas. Algunos de ellos se visualizan mediante diagramas de barras para facilitar los estudios comparativos.

Tabla 2.2. Peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹; peso normalizado de nódulos (PNN) en mg g⁻¹; producción de hidrógeno por la nitrogenasa (H) expresado en $\mu\text{mol H}_2$ (g PS)⁻¹ h⁻¹; actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ (g PS)⁻¹ h⁻¹; actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ planta⁻¹ h⁻¹.

CEPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER
C17	0.14 abc	35ab	21.2 bcde	66 ab	9.6 a	0.68 c
C20	0.11 a	32a	24.1 de	90 cd	9.3 a	0.73 c
C37	0.20 d	64f	21.5 bcde	89 cd	18.0 b	0.76 c
I7	0.14 abc	35ab	28.1 e	78 bc	11.2 a	0.64 b
I24	0.19 d	47cd	16.1 abc	59 ab	11.0 a	0.73 c
L8	0.12 a	37ab	29.1 f	98 d	12.0 a	0.70 c
L16	0.16 bcd	53de	13.8 a	64 ab	10.2 a	0.77 c
L22	0.12 ab	43bc	22.7 cdef	68 ab	8.4 a	0.67 bc
I32	0.14 abc	43bc	14.7 ab	57 a	8.2 a	0.75 c
LM25	0.17 cd	55d	17.2 abcd	59 ab	10.3 a	0.73 c
A19	0.17 cd	71f	23.4 de	51 a	8.9 a	0.55 ab
L19	0.16 bcd	61ef	26.0 e	54 a	8.5 a	0.50 a
MDS (0.05)	0.04	8.5	7.2	19	3.8	0.12

*a-d: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

La masa nodular desarrollada (PSN) presentó una variabilidad entre las cepas utilizadas que osciló entre 0.11 y 0.20 g (Tabla 2.2). Esta patente variabilidad es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Datos muy semejantes se observan en el PNN que relaciona el peso de nódulos con el crecimiento de la planta (Tabla 2.2). Este parámetro varió entre 32 y 71 estableciéndose que las cepas GRC37, GRA19 y GRL19 presentan los valores máximos en ambos parámetros mientras que GRC20, GRI7 y GRC17 presentan los mínimos. También se establece una buena correlación ($r = 0.748$) significativa a $P \leq 0.01$, entre ambos parámetros (Tab. 2.7). El PNN presenta correlación negativa significativa con PEPC y MDH.

Otros datos bioquímicos relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno se exponen a continuación. La actividad reductora de acetileno específica (Fig 2.5) presentó diferencias significativas, destacando con los valores más altos las cepas GRC20, GRC37 y GRL8 con 90-98 μmol de etileno producido por gramo de peso seco de nódulos y por hora. Los valores más bajos, situados entre el 55 y el 60% del máximo, los produjeron las cepas GRA19, GRL19, GRI32, GRLM25 y GRI24.

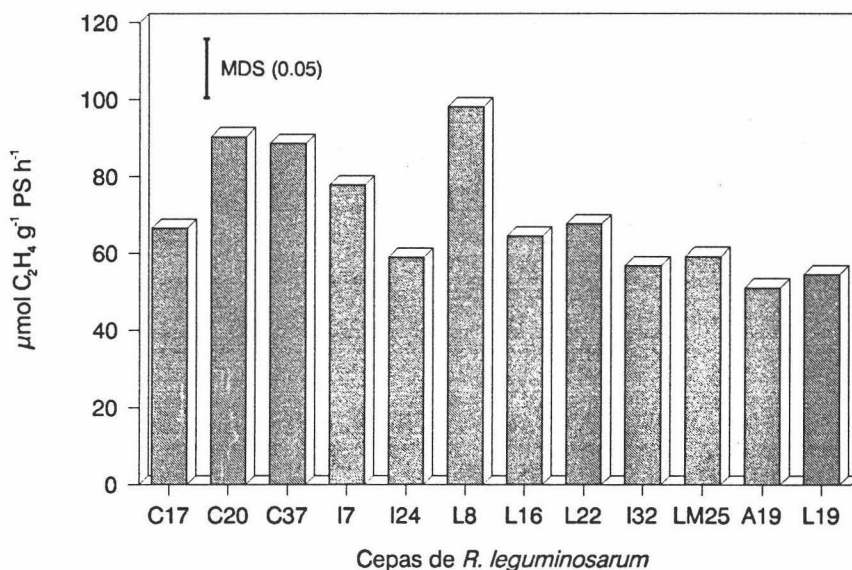


Fig. 2.5. Actividad reductora de acetileno, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

La actividad reductora de acetileno por planta, que se expone en la figura 2.6, no presentó diferencias significativas salvo la cepa GRC37 que presentó un valor de ARAP mayor que todas las demás. Curiosamente se observa que existen cepas que presentan una compensación entre ARA y PSN, de manera que una mayor actividad nitrogenasa produce una menor masa nodular, tal es el caso de GRC20 y GRL8; otro grupo de cepas presentan un comportamiento contrario, es decir, una menor actividad nitrogenasa unida a una buena masa nodular, esto sucede en GRA19, GRL19, GRLM25 y GRI24 aunque encontramos el caso de GRC37 que presenta valores máximos en ambos parámetros, que se manifiesta en la actividad reductora de acetileno total por planta alcanzada (Fig. 2.6).

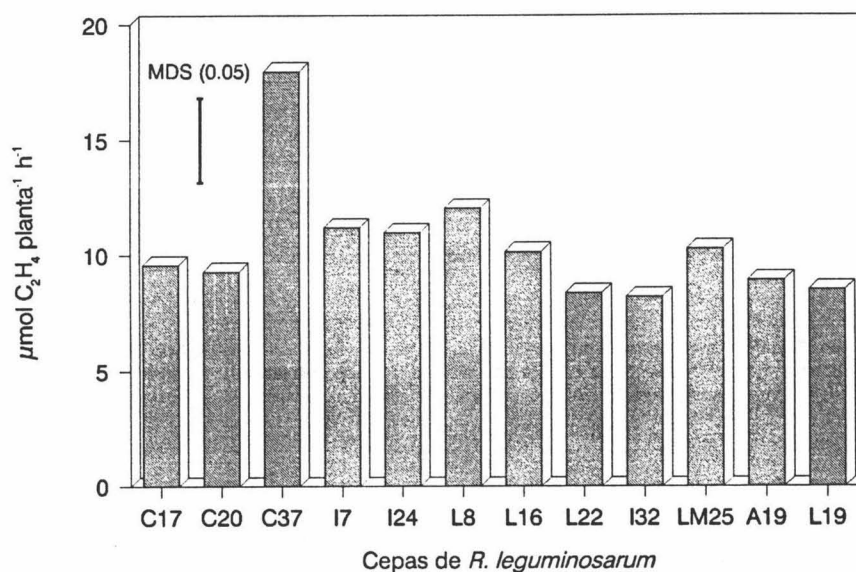


Fig. 2.6. Actividad reductora de acetileno por planta, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

En conjunto la variación encontrada en los datos de ARAP, si exceptuamos la cepa GRC37, oscila entre 8.2 y 12 μmol de etileno por planta y por hora, no presentándose diferencias significativas entre cepas, salvo en la mencionada GRC37 que con un valor de 18.0 superó significativamente a todas las demás.

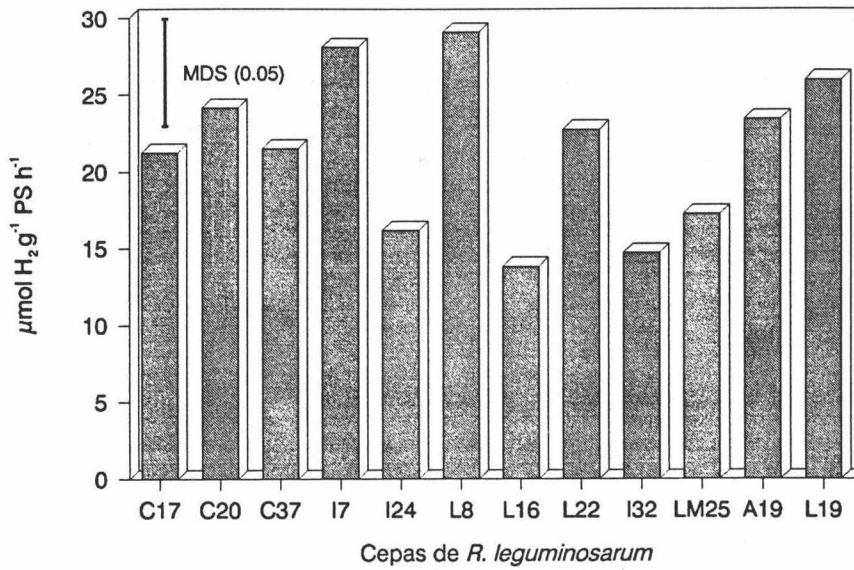


Fig. 2.7. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa, expresada en $\mu\text{mol H}_2 \text{g}^{-1} \text{PS h}^{-1}$, de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

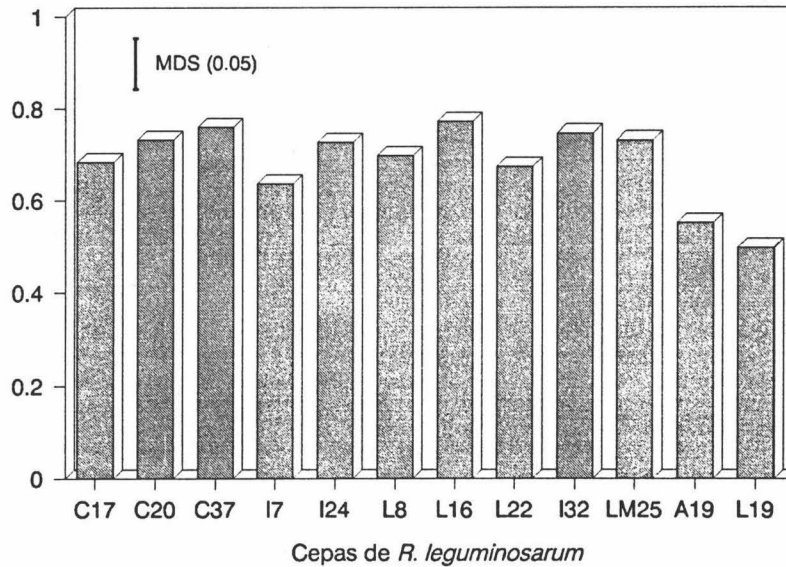


Fig. 2.8. Eficiencia relativa de la fijación de nitrógeno, en plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

La producción de hidrógeno por la nitrogenasa (Fig. 2.7) presentó los máximos valores en las plantas inoculadas con GRL19, GRI7 y GRL8 cuyo valor fue de 26.0, 28.1 y 29.1 micromoles de H_2 producidos por gramo de peso seco de nódulos y por hora, respectivamente. El valor más bajo fue el de GRL16 con 13.8, seguido de GRI32 y GRI24 con valores algo superiores sin diferencias significativas. En este experimento no se encontró correlación entre la producción de hidrógeno y la actividad reductora de acetileno específica (Tab. 2.7). Esto es lógico teniendo en cuenta que las diferentes cepas pueden alcanzar una eficiencia relativa distinta.

La eficiencia relativa (Fig. 2.8) se situó entre valores superiores y próximos al máximo teórico de 0.75 en cepas tales como GRL16, GRC37 y GRI32, y valores cercanos a 0.5 en GRL19 y GRA19. Este parámetro presentó un coeficiente de correlación significativo negativo con la producción de hidrógeno y con la relación raíz/parte aérea (Tab. 2.7).

2.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en los nódulos.

La hidrólisis de la sacarosa en nódulos *Vicia faba* se realiza prioritariamente por medio de la sacarosa sintasa (Fig. 2.9). Los valores detectados oscilaron entre 71

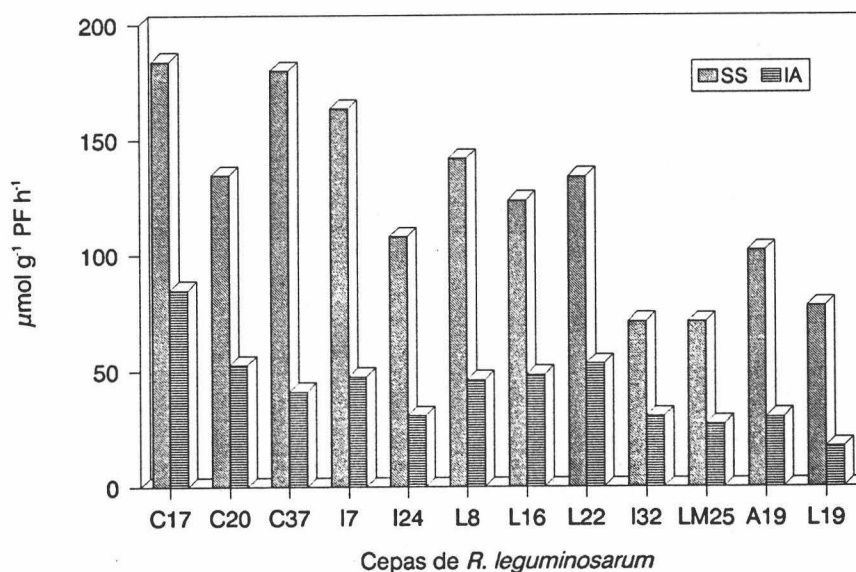


Fig. 2.9. Actividad sacarosa sintasa (SS) expresada en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, y actividad invertasa alcalina expresada en $\mu\text{mol glucosa g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) SS, 6; IA, 4.

y 184 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ lo que equivale a un rango que se sitúa entre 39 y 100%. La actividad es del orden de 2 a 4 veces mayor que la invertasa alcalina, tanto si se expresa por gramo de peso fresco y por hora como si se expresa por mg de proteína (Tab. 2.4). De hecho, se encuentran cepas que provocan una actividad sintasa cuatro veces mayor que la invertasa como GRC37 y GRL19, mientras que en otros casos como GRC17, aun mostrando una gran actividad SS, solo duplica a la actividad IA. Esto mismo sucede en los nódulos producidos por las cepas GRLM25, GRI32, GRL16 y GRC20 que obtienen bajos niveles de actividad SS.

La actividad sintasa se correlaciona positivamente con ARA ($r=0.65$, $P \leq 0.05$) lo que estaría de acuerdo con la idea de que esta enzima es la principal fuente de glucosa para suministro energético del metabolismo de los nódulos. No se correlaciona con los demás parámetros de la fijación de nitrógeno o del crecimiento (Tab. 2.7). También se correlaciona positivamente con las otras enzimas del metabolismo carbonado estudiadas, salvo la PEPC y la ICDH.

La actividad invertasa alcalina es mucho más baja que la sintasa (Fig 2.9) variando entre 85 y 17 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ lo que implica un rango de variación entre 20 y 100%, más amplio que el encontrado para la sintasa. Ambas enzimas de la hidrólisis de la sacarosa presentan un índice de correlación altamente significativo ($P \leq 0.01$, tab. 2.7). Las cepas con mayor actividad IA fueron GRC17, GRL22 y GRC20 y las que presentaron la menor actividad fueron GRL19, GRLM25 y GRA19. Prácticamente coinciden con las que presentaron mayor y menor actividad sintasa.

Es de destacar que la IA presenta coeficientes de correlación positivos y significativos con todas las demás enzimas del metabolismo carbonado estudiadas a excepción de la ICDH, siendo más altos con la MDH y la SS. Curiosamente esta enzima no se correlaciona con ningún parámetro relacionado con el proceso de fijación de nitrógeno. Sin embargo, sí se correlaciona positivamente con parámetros de crecimiento como PSPA y en consecuencia lo hace negativamente con la relación R/PA y con el PNN.

Las dos enzimas que intervienen antes de iniciar el ciclo de las pentosas-fosfato, G6PDH y 6PGDH, cuya actividad se muestra en la figura 2.10, presentan entre ellas una correlación muy alta, del orden de 0.91 ($P \leq 0.01$, Tab. 2.7). En consecuencia las cepas que presentan la máxima actividad G6PDH (GRC17, GRC20, GRC37 y GRL22) también producen los mayores valores de 6PGDH, mientras que GRA19, GRI32 y GRL16 presentan los menores niveles de ambas actividades enzimáticas. Las

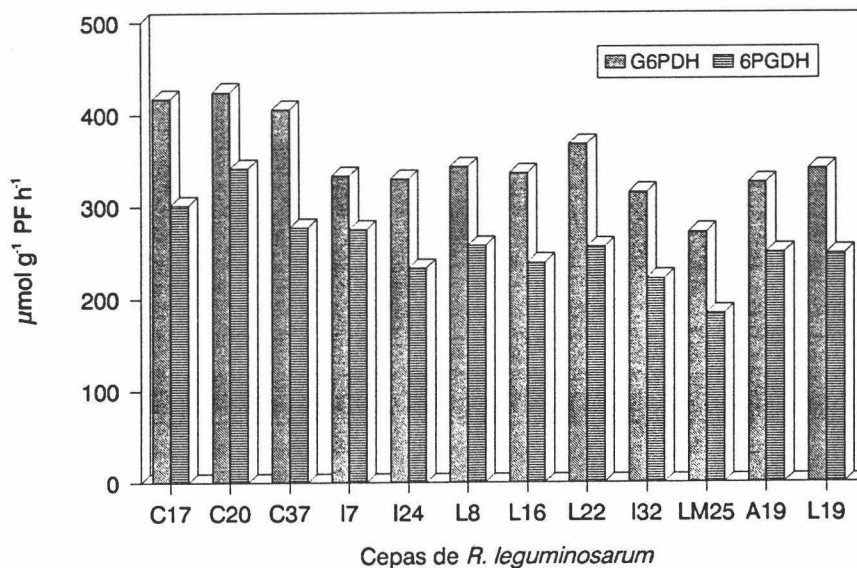


Fig. 2.10. Actividad glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) y 6-P-gluconato deshidrogenasa (6PGDH) expresadas en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) G6PDH, 14; 6PGDH, 9.

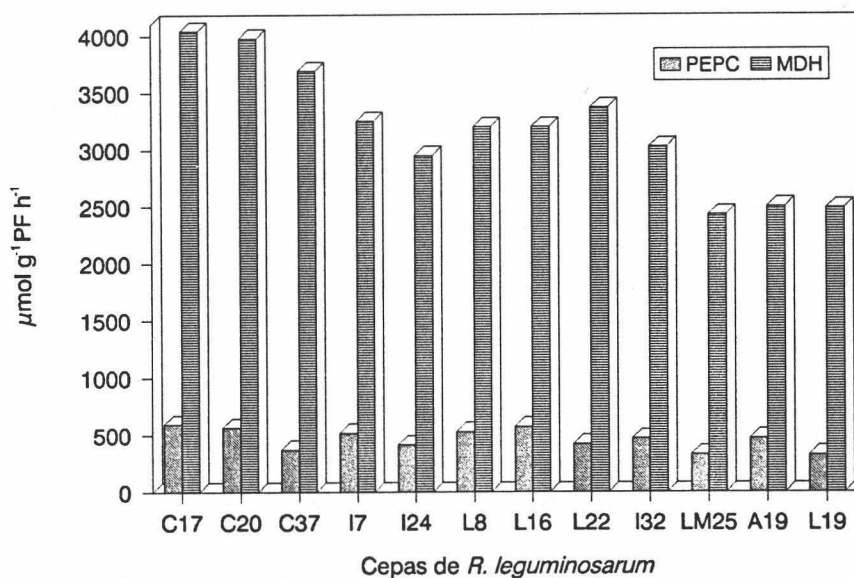


Fig. 2.11. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y actividad malato deshidrogenasa (MDH) expresada en $\mu\text{mol NAD}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) PEPC, 33; MDH, 100.

actividades más bajas son del orden del 65% de las mayores, siendo la 6PGDH del orden de un 30% menor que la G6PDH.

Ambas enzimas no exhiben ninguna correlación con los parámetros de crecimiento estudiados. Sin embargo, sí muestran una correlación significativa ($P \leq 0.05$) con la actividad nitrogenasa (ARA) y con el nitrógeno total en raíz (Tab. 2.9). Estas actividades enzimáticas también se correlacionan positivamente ($P \leq 0.001$ en algunos casos) con otras enzimas del metabolismo carbonado estudiadas (MDH, SS, IA, etc.) tal como se detalla en la tabla 2.7.

Las actividades relacionadas con la carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico y la formación del malato se exhiben en el diagrama de barras de la figura 2.11. De nuevo se pone de manifiesto que el nivel de actividad MDH es entre 5 (GRA19) y 10 veces (GRC37) mayor que el de la PEPC. Es por ello que la actividad MDH se podría haber expresado en milimoles y si se ha hecho en micromoles ha sido por mantener las mismas unidades de las otras enzimas estudiadas, a efectos comparativos.

Las cepas con mayor nivel de actividad son las mismas según se exprese por gramo de PF y por hora (Tab. 2.3) o por miligramo de proteína (Tab. 2.4). Así, las cepas GRC17, GRC20, GRL8 y GRA16 muestran la máxima actividad PEPC y las

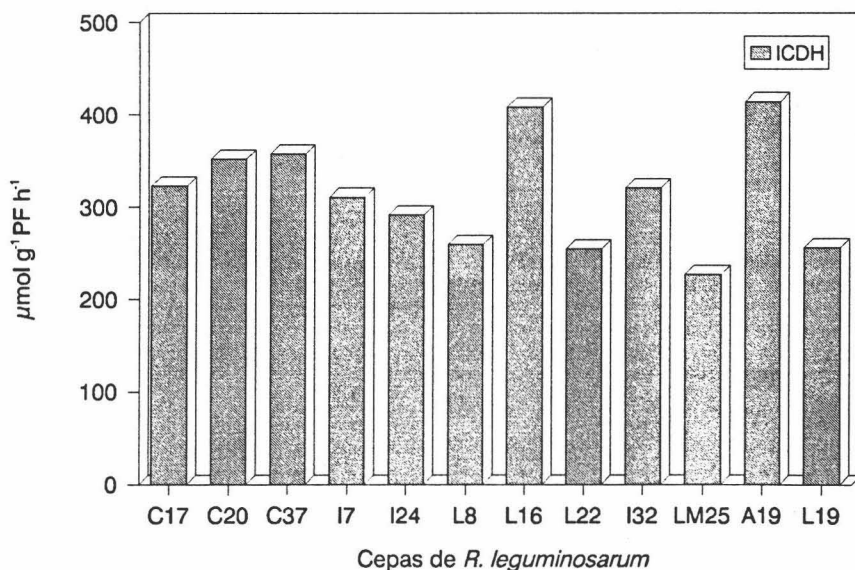


Fig. 2.12. Actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH) expresada en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en el citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) 21.

GRLM25, GRA19 y GRL19 la menor en ambas formas de expresar esta actividad. El comportamiento que muestran el conjunto de cepas en estudio frente a la actividad MDH es bastante semejante al descrito para la PEPC, no en vano el coeficiente de correlación (Tab. 2.7) que muestran ambas actividades es significativo.

Estas enzimas no muestran correlación con las variables relacionadas con el proceso de fijación de nitrógeno, excepto la MDH que se correlaciona positivamente con ARA y ambas negativamente con PNN. En cambio si presentaron correlación significativa, principalmente la actividad MDH, con las enzimas de la vía de las pentosas-fosfato (G6PDH y 6PGDH) y las de la degradación de la sacarosa (SS, IA). Respecto a los parámetros de crecimiento solo indicar la correlación negativa que se observa entre la actividad PEPC y RPA. No se encontraron correlaciones entre estas enzimas y el contenido de nutrientes (Tab. 2.9).

Por último, la actividad isocitrato deshidrogenasa (Fig. 2.12) alcanzó valores entre 227 y 414 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$. La cepas con mayor actividad fueron GRA19, GRL16, GRC37 y GRC20, y las de menor actividad, GRLM25, GRL22 y GRL19. Presentó un coeficiente de correlación alto (0.87) con el contenido en proteína soluble, pero no con las demás enzimas del metabolismo carbonado estudiadas, ni con los parámetros de crecimiento o fijación de nitrógeno, ni con la adquisición de nutrientes.

En la tabla 2.3 se recopilan los datos de las actividades enzimáticas estudiadas en este apartado, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, así como las mínimas diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Esto datos son medias de cuatro repeticiones procedentes de al menos dos experimentos distintos con cada cepa.

El contenido de proteína soluble de los nódulos (Tab. 2.3) varió entre 10.1 y 15.4 miligramos de proteína por gramo de peso fresco. Las cepas que produjeron nódulos con mayor contenido de proteínas fueron GRA19, GRC17 y GRL16, mientras que GRLM25, GRL22 y GRL8 produjeron los valores más bajos. El nivel de proteína solo presentó correlación significativa con la actividad ICDH (Tab. 2.7). Con ayuda de estos datos se ha elaborado la tabla 2.4 en la que se exponen las actividades enzimáticas de metabolismo carbonado estudiadas, expresadas en función del contenido de proteína. Los resultados son, en general, similares a los de las actividades específicas anteriormente comentadas.

Tabla 2.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} , y contenido de proteína soluble en mg/g PF en citosol nodular de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con diferentes cepas de *R. leguminosarum*.

CEPA	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
C17	184 ^h	85 ^f	417 ^{fg}	301 ^g	595 ^f	4042 ^g	323 ^d	13.7 ^e
C20	135 ^e	53 ^e	424 ^g	341 ^h	566 ^f	3977 ^g	352 ^e	13.3 ^d
C37	180 ^h	41 ^c	405 ^f	277 ^f	374 ^b	3688 ^f	358 ^e	12.8 ^{cde}
I7	163 ^g	48 ^d	333 ^{cd}	275 ^f	518 ^e	3250 ^d	311 ^{cd}	11.8 ^b
I24	108 ^c	31 ^b	329 ^{bc}	233 ^c	414 ^c	2949 ^b	292 ^c	12.3 ^{bcd}
L8	142 ^f	46 ^d	343 ^d	257 ^e	530 ^e	3197 ^c	260 ^b	11.3 ^a
L16	124 ^d	48 ^d	336 ^{cd}	239 ^d	575 ^f	3199 ^c	408 ^f	13.4 ^d
L22	134 ^e	53 ^e	367 ^e	256 ^e	423 ^c	3366 ^e	255 ^b	11.3 ^{ab}
I32	71 ^a	31 ^b	315 ^b	222 ^b	471 ^d	3026 ^b	321 ^d	11.9 ^{bc}
LM25	71 ^a	27 ^b	272 ^a	184 ^a	329 ^a	2429 ^a	227 ^a	10.1 ^a
A19	102 ^c	30 ^b	325 ^{bc}	250 ^e	474 ^d	2498 ^a	414 ^f	15.4 ^f
L19	78 ^b	17 ^a	340 ^d	248 ^{de}	327 ^a	2484 ^a	257 ^b	12.0 ^{bc}
MDS (0.05)	6	4	14	9	33	100	21	1.25

*a-h: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

Tabla 2.4. Actividades enzimáticas de las enzimas del metabolismo carbonado en $\text{nmol (mg prot.)}^{-1} \text{min}^{-1}$, en citosol nodular de plantas de *Vicia faba* inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

CEPA	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH
C17	225 ^h	103 ^h	509 ^e	367 ^e	726 ^f	4933 ^g	394 ^b
C20	168 ^r	66 ^f	530 ^f	426 ^g	708 ^f	4971 ^h	440 ^c
C37	235 ⁱ	54 ^d	528 ^f	361 ^e	487 ^{ab}	4808 ^{fg}	467 ^c
I7	231 ^h	67 ^f	471 ^d	389 ^f	733 ^f	4602 ^e	440 ^c
I24	146 ^d	42 ^c	445 ^c	315 ^c	559 ^d	3984 ^c	394 ^b
L8	208 ^g	68 ^f	504 ^e	378 ^a	779 ^g	4699 ^{ef}	382 ^{ab}
L16	154 ^d	60 ^e	418 ^b	298 ^b	717 ^f	3988 ^c	509 ^d
L22	198 ^f	79 ^g	543 ^f	379 ^f	625 ^e	4979 ^h	377 ^{ab}
I32	100 ^a	43 ^c	442 ^c	311 ^{bc}	662 ^e	4252 ^d	451 ^c
LM25	117 ^c	45 ^c	446 ^c	302 ^{bc}	540 ^{cd}	3991 ^c	374 ^a
A19	111 ^{bc}	33 ^b	353 ^a	271 ^a	514 ^{bc}	2712 ^a	450 ^c
L19	108 ^{ab}	24 ^a	473 ^d	346 ^d	456 ^a	3460 ^b	357 ^a
MDS (0.05)	8	5	18	13	42	135	28

*a-h: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

2.4. Determinaciones analíticas.

En las tablas 2.5 y 2.6 se exponen los resultados de las determinaciones de algunos macronutrientes como N, K, Ca y Mg en raíz y parte aérea, expresados en porcentaje y en miligramos por planta, respectivamente. Los coeficientes de correlación entre estos resultados y los demás parámetros estudiados se exponen en las tablas 2.8 y 2.9.

Tabla 2.5. Contenido en N, K, Ca y Mg expresado como porcentaje de peso seco, en parte aérea y raíz de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con diferentes cepas de *R. leguminosarum*.

CEPA	Parte aérea				Raíz			
	N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
C17	4.89	4.50	0.86	0.64	3.82	6.48	0.94	0.96
C20	5.23	4.30	0.80	0.59	3.11	6.13	0.79	1.15
C37	4.31	4.14	0.75	0.65	4.26	6.60	0.80	0.70
I7	3.73	4.53	0.65	0.63	2.64	5.98	0.75	1.48
I24	3.82	4.66	0.69	0.55	2.79	5.90	1.01	1.66
L8	4.17	4.68	0.65	0.62	3.22	6.73	2.53	1.51
L16	5.54	5.44	1.02	0.62	3.09	6.80	0.69	1.02
L22	4.13	4.19	0.51	0.44	2.75	6.78	0.72	0.59
I32	3.40	4.17	0.78	0.60	3.11	6.02	0.92	0.57
LM25	5.20	4.58	0.76	0.61	2.73	5.56	1.02	0.63
A19	4.85	5.26	0.77	0.61	3.20	5.89	0.96	0.57
L19	5.85	5.55	1.00	0.62	3.07	6.56	0.68	1.00
MDS (0.05)	0.49	0.58	0.20	0.10	0.45	0.66	0.18	0.16

La adquisición de los nutrientes en parte aérea y raíz viene condicionada por la cepa. De hecho, la variabilidad que se establece en los datos obtenidos, tomando el máximo valor como 100, es del 70% para el K en raíz y parte aérea; del 60% para el N en ambos órganos y Mg en parte aérea; del 40% para el Ca en parte aérea y del 20% para Ca y Mg en raíz, representando estos porcentajes los valores mínimos alcanzados.

Esta variabilidad induce curiosas correlaciones significativas entre los nutrientes en parte aérea como: N con K y con Ca, Ca con Mg. No se observan correlaciones significativas entre los contenidos de nutrientes en raíz, ni entre estos y los de la parte aérea.

Es interesante señalar que aparecen algunas correlaciones positivas significativas entre el contenido de Mg en raíz y parámetros de crecimiento como PSR, PSPA y PSP ($P \leq 0.05$, Tab. 2.8). Por último, el N de raíz lo hace con la actividad G6PDH.

De los datos de nitrógeno acumulado por las plantas que crecen a expensas del nitrógeno fijado como única fuente de nitrógeno se puede deducir que *Vicia faba* con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* estudiadas da lugar a simbiosis de muy diferente redimiento; se puede decir que hay simbiosis muy efectivas, como las que se producen con las cepas GRL19, GRL16 y GRLM25 entre otras, y otras que son hasta un 40% menos efectivas (GRI32).

En general se puede asumir que la cepa GRI32 provoca la menor adquisición de los nutrientes estudiados tanto en parte aérea como en raíz, existiendo un grupo de cepas que inducen en la planta un estado nutricional bastante similar (GRC17, GRC37, GRI24 entre otras).

Tabla 2.6. Contenido en N, K, Ca y Mg expresado en mg planta⁻¹, en parte aérea y raíz de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con diferentes cepas de *R. leguminosarum*.

CEPA	Parte aérea				Raíz			
	N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
C17	197	182	35	26	50	85	12	13
C20	183	151	28	21	39	77	10	14
C37	138	133	24	21	54	84	10	9
I7	153	185	26	26	38	86	11	21
I24	154	188	28	22	40	85	15	24
L8	140	157	22	21	42	88	33	20
L16	166	163	31	19	29	65	7	10
L22	123	125	15	13	31	76	8	7
I32	115	142	27	20	37	72	11	7
LM25	167	147	24	20	29	59	11	7
A19	119	129	19	15	31	57	9	5
L19	151	144	26	16	36	76	8	12
MDS (0.05)	43	42	7	5	11	22	3	4

Tabla. 2.7. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular, en plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con 12 cepas diferentes de *Rhizobium leguminosarum*. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco por planta; PSN peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; H, producción de hidrógeno en aire; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; ER, eficiencia relativa; RPA, relación raíz/parte aérea; SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular.

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
PSR	1.000																	
PSPA	0.827	1.000																
PSP	0.895	0.990	1.000															
RPA	-0.146	-0.659	-0.547	1.000														
PSN	-0.069	-0.127	-0.075	0.320	1.000													
PNN	-0.583	-0.736	-0.693	0.654	0.748	1.000												
H	0.321	-0.034	0.032	0.414	-0.417	-0.189	1.000											
ARA	0.440	0.312	0.340	-0.043	-0.372	-0.481	0.514	1.000										
ARAP	0.324	0.171	0.239	0.245	0.515	0.212	0.102	0.575	1.000									
ER	0.148	0.448	0.396	-0.591	0.031	-0.360	-0.571	0.384	0.386	1.000								
SS	0.449	0.463	0.475	-0.176	-0.125	-0.354	0.378	0.649	0.551	0.209	1.000							
IA	0.237	0.500	0.439	-0.572	-0.455	-0.608	0.118	0.398	0.038	0.287	0.786	1.000						
G6PDH	0.298	0.223	0.240	-0.001	-0.271	-0.323	0.288	0.538	0.269	0.114	0.743	0.682	1.000					
6PGDH	0.355	0.275	0.288	-0.065	-0.443	-0.440	0.491	0.581	0.122	-0.038	0.694	0.627	0.911	1.000				
PEPC	0.107	0.387	0.315	-0.641	-0.552	-0.597	0.073	0.345	-0.176	0.253	0.499	0.737	0.434	0.574	1.000			
MDH	0.414	0.522	0.502	-0.387	-0.384	-0.608	0.117	0.636	0.289	0.460	0.810	0.842	0.885	0.809	0.620	1.000		
ICDH	-0.318	-0.163	-0.192	-0.100	0.195	0.279	-0.224	-0.027	0.132	0.104	0.255	0.184	0.301	0.347	0.514	0.251	1.000	
PRT	-0.247	-0.195	-0.203	0.045	0.147	0.297	-0.022	-0.148	-0.042	-0.230	0.260	0.247	0.422	0.467	0.471	0.224	0.874	1.000

P _≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.576	0.708	0.823

Tabla 2.8. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y el contenido en N, K, Na, Ca y Mg de raíz y parte aérea, de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con 12 cepas diferentes de *R. leguminosarum*. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco de planta completa; RPA, relación de peso seco de raíz/parte aérea; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; H, producción de hidrógeno; ARA, actividad reductora de acetileno; ER, eficiencia relativa; ARAP, actividad reductora de acetileno por planta; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz.

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r
PSR	1.000																	
PSPA	0.827	1.000																
PSP	0.895	0.990	1.000															
RPA	-0.146	-0.659	-0.547	1.000														
PSN	-0.069	-0.127	-0.075	0.320	1.000													
PNN	-0.583	-0.736	-0.693	0.654	0.748	1.000												
H	0.321	-0.034	0.032	0.414	-0.417	-0.189	1.000											
ARA	0.440	0.312	0.340	-0.043	-0.372	-0.481	0.514	1.000										
ARAP	0.324	0.171	0.239	0.245	0.515	0.212	0.102	0.575	1.000									
ER	0.148	0.448	0.396	-0.591	0.031	-0.360	-0.571	0.384	0.386	1.000								
N	-0.567	-0.501	-0.535	0.154	0.054	0.350	0.014	-0.171	-0.194	-0.314	1.000							
K	-0.478	-0.516	-0.518	0.267	0.240	0.507	0.023	-0.448	-0.293	-0.560	0.650	1.000						
Ca	-0.389	-0.283	-0.307	0.030	0.242	0.323	-0.305	-0.319	-0.139	-0.133	0.728	0.662	1.000					
Mg	0.075	0.097	0.115	0.016	0.301	0.176	0.094	0.166	0.398	-0.014	0.256	0.269	0.579	1.000				
N _r	0.049	-0.039	0.000	0.245	0.292	0.227	0.021	0.324	0.615	0.168	0.095	-0.176	0.259	0.498	1.000			
K _r	-0.089	-0.226	-0.213	0.229	-0.249	-0.080	0.210	0.374	0.184	0.020	0.173	0.120	0.133	-0.118	0.395	1.000		
Ca _r	0.220	0.091	0.115	0.013	-0.264	-0.255	0.370	0.489	0.174	0.104	-0.234	-0.047	-0.304	0.142	0.049	0.150	1.000	
Mg _r	0.702	0.606	0.642	-0.230	-0.108	-0.490	0.315	0.399	0.142	0.058	-0.173	0.116	-0.086	0.128	-0.245	0.033	0.389	1.000

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.576 0.708 0.823

Tabla 2.9. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular y el contenido en N, K, Na, Ca y Mg en raíz y parte aérea, en plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con 12 cepas de *R. leguminosarum*. Variables: SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz.

	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r
SS	1.000															
IA	0.786	1.000														
G6PDH	0.743	0.682	1.000													
6PGDH	0.694	0.627	0.911	1.000												
PEPC	0.499	0.737	0.434	0.574	1.000											
MDH	0.810	0.842	0.885	0.809	0.620	1.000										
ICDH	0.255	0.184	0.301	0.347	0.514	0.251	1.000									
PRT	0.260	0.247	0.422	0.467	0.471	0.224	0.874	1.000								
N	-0.172	-0.046	0.102	0.097	-0.052	-0.142	0.129	0.239	1.000							
K	-0.356	-0.354	-0.342	-0.243	-0.037	-0.563	0.229	0.331	0.650	1.000						
Ca	-0.227	-0.110	0.025	0.000	0.100	-0.114	0.380	0.369	0.728	0.662	1.000					
Mg	0.171	-0.005	0.030	0.100	0.173	0.024	0.333	0.262	0.256	0.269	0.579	1.000				
N _r	0.546	0.353	0.629	0.397	0.116	0.506	0.393	0.432	0.095	-0.176	0.259	0.498	1.000			
K _r	0.453	0.389	0.495	0.320	0.242	0.415	0.072	0.070	0.173	0.120	0.133	-0.118	0.395	1.000		
Ca _r	0.075	0.042	-0.130	-0.084	0.180	-0.042	-0.299	-0.245	-0.234	-0.047	-0.304	0.142	0.049	0.150	1.000	
Mg _r	0.276	0.114	0.072	0.250	0.309	0.162	-0.150	-0.116	-0.173	0.116	-0.086	0.128	-0.245	0.033	0.389	1.000

P ≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.576	0.708	0.823

3. Efecto del genotipo de la planta sobre el crecimiento, fijación de nitrógeno y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.

En este experimento se utilizaron doce líneas puras de *Vicia faba* y el cultivar comercial Alborea con el fin de estudiar la influencia del genotipo de la planta huésped en la fijación de nitrógeno y el metabolismo carbonado del nódulo. La procedencia de las líneas puras utilizadas y algunas de sus características se exponen en el apartado de Material y Métodos (1.1) de esta memoria. Como microsimbionte se utilizó la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Las plantas se recogieron siempre tras la aparición de los botones florales, por lo que los datos proceden de plantas con igual estado de desarrollo fenológico, aunque la edad cronológica puede ser diferente.

3.1. Análisis del crecimiento.

El peso seco de parte aérea, que se expone en el diagrama de barras de la figura 3.1, varió entre 1.19 y 6.39 gramos. Los genotipos que alcanzaron mayor desarrollo fueron VF50, 166 y 44, y los de menor fueron VF125 y 147. Algo semejante

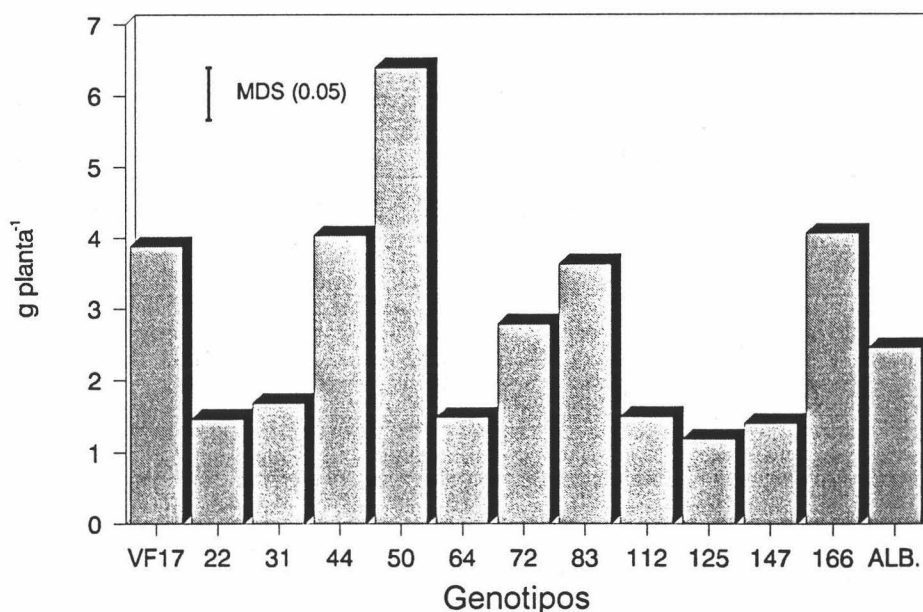


Fig. 3.1. Peso seco de parte aérea, expresado en g planta⁻¹, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

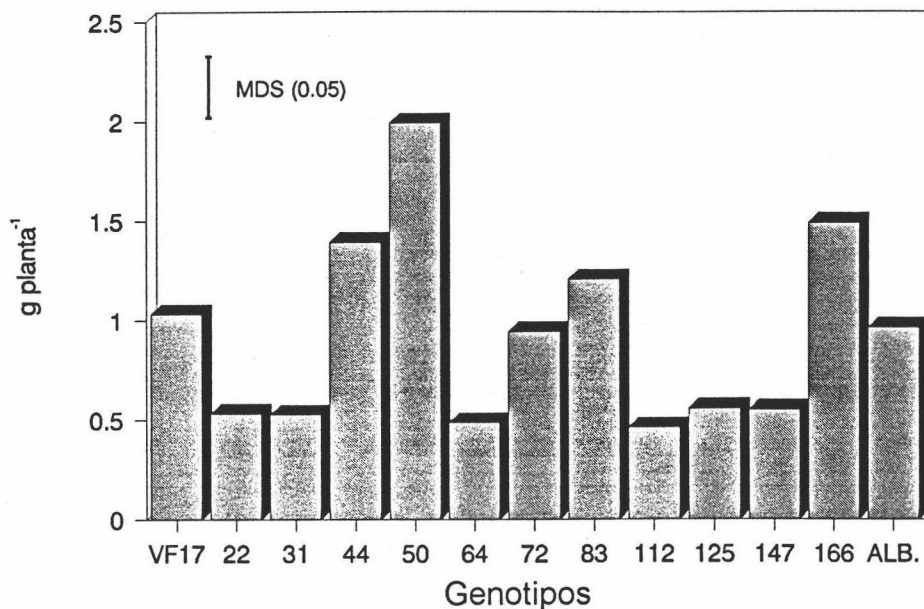


Fig. 3.2. Peso seco de raíz, expresado en g planta⁻¹, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

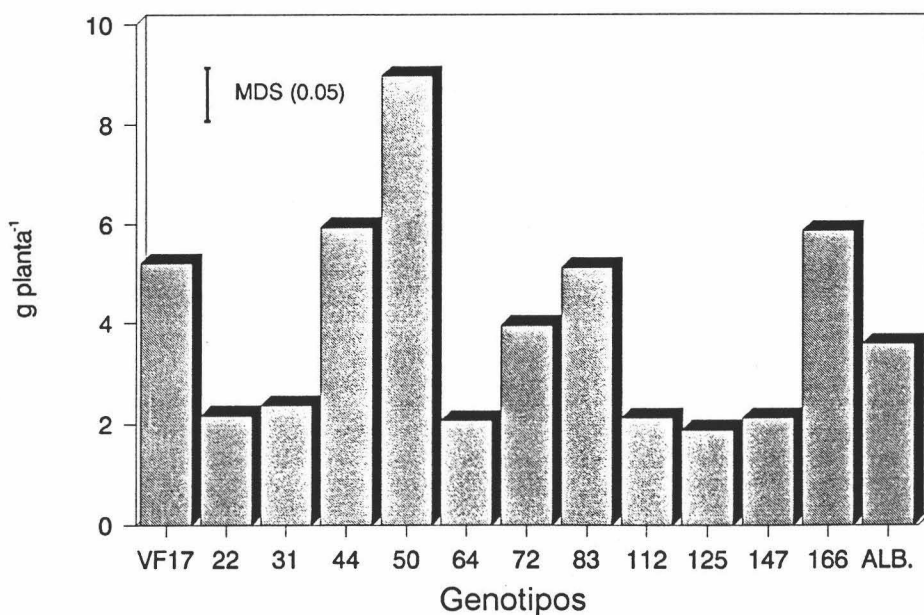


Fig. 3.3. Peso seco total por planta, expresado en g planta⁻¹, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

se observa en el peso seco de raíz (Fig. 3.2) que osciló entre 0.46 y 1.99 gramos. La variación de ambos parámetros, tomando el genotipo de máximo crecimiento como 100, se situó en torno al 80% (el mínimo en parte aérea fue del 23% y en raíz del 18%).

En la figura 3.3 se representa el peso seco de la planta completa, detectándose valores entre 1,88 y 8,98 gramos. En términos comparativos esta variación indica que hay genotipos que crecen casi 5 veces más que otros, existiendo entre ellos un amplio comportamiento. Como respuesta a su crecimiento se pueden establecer 3 grupos, el primero de ellos constituido por los genotipos VF112, 125, 147, 64, 22 y 31 que son los de menor crecimiento. Un segundo grupo de crecimiento intermedio en el que se incluirían los genotipos VF83, 72, 17 y el cultivar Alborea y por último el tercer grupo, que recoge a VF44, 50 y 166 cuyo crecimiento es de 3 a 5 veces superior a la media de los del primer grupo.

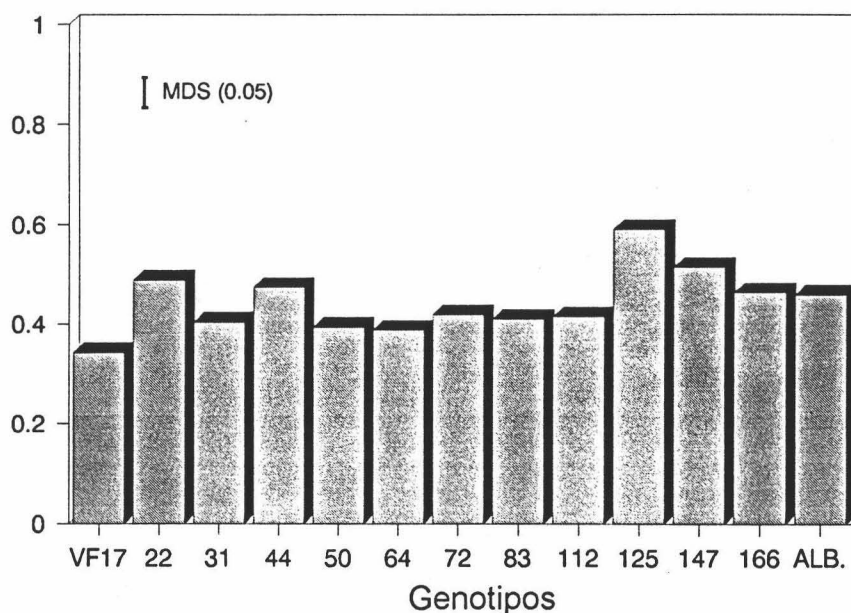


Fig. 3.4. Relación de peso seco de raíz/parte aérea, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

La relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA, fig. 3.4) se establece entre 0,34 y 0,59. Este fue otro de los parámetros relacionados con el crecimiento, cuyos valores fueron muy variables entre los genotipos. Se puede apreciar que los valores

más altos corresponden a algunos genotipos englobados (según la clasificación anterior) en el primer grupo (VF22, 125 y 147). El resto de los valores están comprendidos entre 0.34 y 0.46.

En general se aprecia una gran variabilidad en el desarrollo de los diversos genotipos, muy superior a la encontrada en el experimento 2 lo que indica que, si bien el microsimbionte puede dar lugar a diferencias en el desarrollo de la planta, el genotipo de esta condiciona cambios en el crecimiento más patentes.

Los coeficientes de correlación simple entre los diversos componentes del peso seco fueron superiores a 0,97 (Tab. 3.7). El peso seco de raíz, parte aérea y planta completa, así como la relación de peso seco de raíz/parte aérea, se resumen en la tabla 3.1 con las mínimas diferencias significativas. Los datos son media de seis repeticiones procedentes de al menos dos experimentos con cada genotipo.

Tabla 3.1. Peso seco de raíz (PSR), parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP) expresados en g planta⁻¹; relación de peso seco de raíz/parte aérea (RPA), en 13 genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

Genotipo	PSR	PSPA	PSP	RPA
VF17	1.03 bc	3.9 e	5.2 de	0.34 a
VF22	0.53 a	1.5 ab	2.2 a	0.49 d
VF31	0.53 a	1.7 ab	2.4 ab	0.40 abc
VF44	1.39 c	4.0 e	5.9 e	0.47 d
VF50	1.99 e	6.4 f	9.0 f	0.39 ab
VF64	0.49 a	1.5 a	2.1 a	0.39 ab
VF72	0.95 b	2.8 cd	4.0 cd	0.42 b
VF83	1.21 bcd	3.6 de	5.1 de	0.41 b
VF112	0.46 a	1.5 ab	2.1 a	0.42 b
VF125	0.56 a	1.2 a	1.9 a	0.59 e
VF147	0.55 a	1.4 a	2.1 a	0.52 d
VF166	1.49 d	4.1 e	5.9 e	0.46 cd
ALBOREA	0.96 b	2.4 bc	3.6 bc	0.46 cd
MDS (0.05)	0.38	0.9	1.3	0.06

*a-f: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$, según un test de mínimas diferencias significativas.

3.2. Fijación de nitrógeno.

La masa nodular (Tab. 3.2) al igual que los datos de crecimiento, varió entre 0,10 y 0,58 gramos, estableciéndose un rango entre 20-100% semejante al ya comentado. Los genotipos con mayor masa nodular fueron VF50, 44 y 166, que coinciden con los que presentan mayor crecimiento, mientras que los de menor fueron VF64, 125 y 31 entre otros. Por tanto, con arreglo al PSN estos genotipos se pueden clasificar en los mismos tres grupos que se hicieron para el peso seco total por planta. El PSN guarda una correlación positiva y altamente significativa ($r > 0.91$) con PSR, PSPA y PSP, así como con la actividad nitrogenasa total por planta (ARAP) con un coeficiente de correlación $r = 0.68$, tal como se observa en la tabla 3.7.

Tabla 3.2. Peso seco de nódulos (PSN), en g planta⁻¹, peso normalizado de nódulos (PNN), en mg g⁻¹, producción de hidrógeno por la nitrogenasa (H) expresado en $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, actividad reductora de acetileno (ARA) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, actividad reductora de acetileno por planta (ARAP) en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, eficiencia relativa (ER), en 13 genotipos de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*.

Genotipo	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER
VF17	0.30 cd	80 abc	10.2 bcd	54.5 bcde	16.2 c	0.81 cde
VF22	0.17 ab	119 e	18.2 ef	86.8 f	14.6 bc	0.79 cd
VF31	0.16 ab	91 cd	14.1 cde	64.3 def	9.9 ab	0.79 cd
VF44	0.52 e	127 f	8.8 abc	66.3 ef	34.6 d	0.87 ef
VF50	0.58 e	92 cd	2.3 a	22.6 a	12.7 bc	0.90 f
VF64	0.10 a	66 a	10.1 bcd	55.8 bcde	5.5 a	0.82 de
VF72	0.22 bc	80 abc	4.3 ab	44.6 abcde	9.5 ab	0.91 f
VF83	0.30 cd	82 abc	11.3 bcde	35.9 ab	10.6 abc	0.68 b
VF112	0.16 ab	107 de	16.6 def	63.3 cde	9.6 abc	0.74 bc
VF125	0.14 ab	117 ef	11.7 cde	41.2 abcd	6.0 a	0.75 bcd
VF147	0.17 ab	122 e	8.8 abc	54.3 bcde	8.9 ab	0.84 ef
VF166	0.33 d	85 bc	10.3 bcd	40.1 abc	13.1 bc	0.75 bcd
ALBOREA	0.17 ab	71 ab	22.6 f	51.1 bcde	9.2 ab	0.55 a
MDS (0.05)	0.08	16	7.0	23.3	6.6	0.07

*a-f: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$, según un test de mínimas diferencias significativas.

En cuanto al peso normalizado de nódulos, que relaciona el peso seco de los mismos con la parte aérea de la planta, la variabilidad fue más patente y con una alta

significación estadística, oscilando entre valores cercanos a 60-80 mg g⁻¹ en las líneas VF64, Alborea y VF72 y 100-120 mg g⁻¹ en VF22, 44, 112, 125 y 147. Es interesante resaltar que algunos genotipos con menor PSN presentan, sin embargo, altos valores de PNN, como es el caso de VF22, 112, 125 y 147. Lo contrario, un bajo valor de PNN con un PSN alto ocurre en el genotipo VF50 y 166. El caso de VF44 destaca por tener altos valores en ambos parámetros de nodulación.

El peso normalizado de nódulos puede considerarse un índice idóneo para relacionar la incidencia de ciertos factores, como el genotipo de la planta huésped sobre el crecimiento de los nódulos. Este dato presenta un coeficiente de correlación significativo $r = 0.65$ ($P < 0.05$) con la relación RPA (Tab. 3.7), así como con el contenido de nitrógeno en la raíz $r = 0.75$ que es significativo para $P \leq 0.01$ (Tab. 3.8).

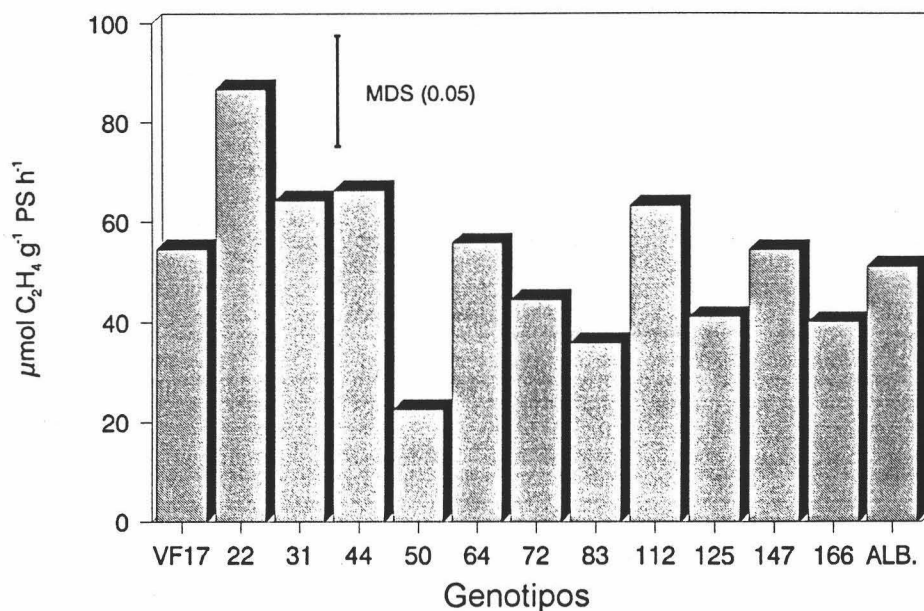


Fig. 3.5. Actividad reductora de acetileno específica, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

En la figura 3.5 se representan los datos de actividad reductora de acetileno en los distintos genotipos, que también se desarrolló entre márgenes amplios, de 23 a 87 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, presentando diferencias significativas entre genotipos. Los que

presentaron los máximos valores de ARA fueron VF22, 31 y 44, mientras que los valores más bajos se obtuvieron con VF50, 83, 166, 125 y 72. Al relacionar la actividad nitrogenasa específica con los parámetros de crecimiento (Tab. 3.1) se observa en ellos una correlación significativa negativa (Tab. 3.8). Ello obliga a señalar algunos comportamientos curiosos de determinados genotipos. Así, VF44 presenta una buena producción de biomasa, los parámetros de nodulación más altos y una activa nitrogenasa que se traduce en la máxima ARAP detectada (Fig. 3.6), en cambio otros cultivares como VF22, 112 y 31 enmarcados en el grupo de menor crecimiento (Tabla 3.1) presentan una activa nitrogenasa y una ER (Fig. 3.7) que se sitúa entre 0.75 y 0.79. Por último destacar el cultivar VF44, con unos niveles de actividad nitrogenasa intermedios, con la máxima ER obtenida (0.90) y considerado como un cultivar de gran productividad.

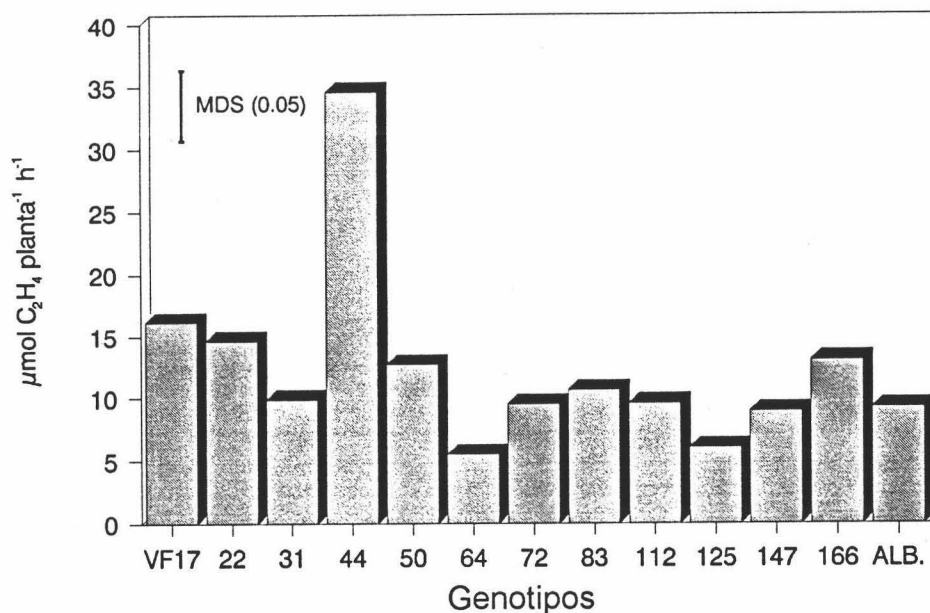


Fig. 3.6. Actividad reductora de acetileno total por planta, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Al estudiar la actividad reductora de acetileno por planta (Fig. 3.6) se observa también el destacado nivel alcanzado por el genotipo VF44, así como la variabilidad existente ya que se obtienen valores desde 5.5 hasta 34.6 $\mu\text{mol planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, lo que

indica que hay cultivares que presentan una ARAP seis veces superior a otros. Ello vuelve a incidir en la influencia del genotipo del macrosimbionte en la fijación de nitrógeno. Los valores más altos correspondieron a VF44, 17 y 22. Los más bajos son los de VF64, 125 y 147. Existe correlación positiva entre ARAP y PSN ($r = 0.68$, $P \leq 0.01$).

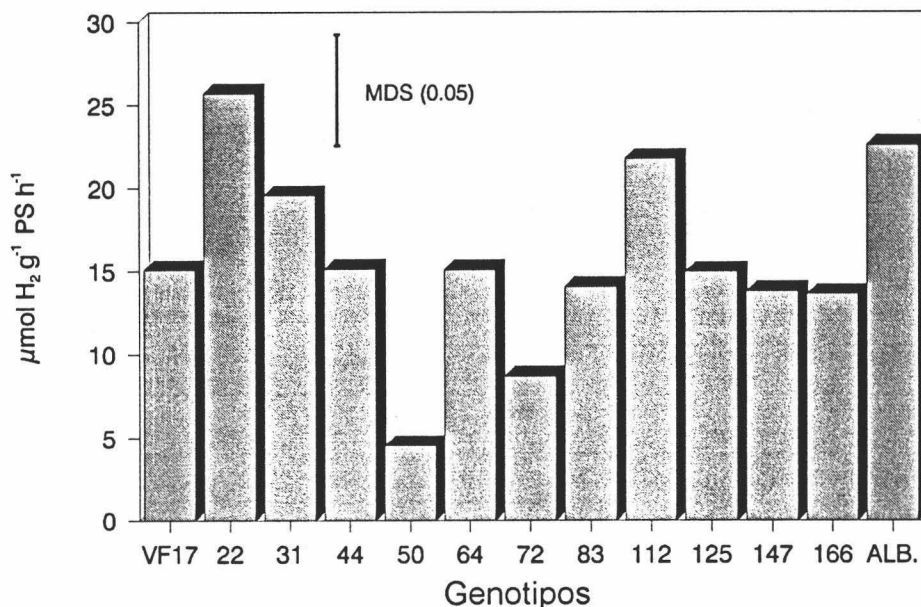


Fig. 3.7. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa, expresada en $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

La producción de hidrógeno en aire (Fig 3.7) mostró una correlación positiva significativa $r = 0.56$ ($P < 0.05$, Tab. 3.8) con el ARA específica y negativa con ER, PSN y PSPA. Se demostró que existían diferencias significativas entre los diversos genotipos, presentando los mayores valores VF22, Alborea y 112 que también exhiben una buena actividad nitrogenasa y los menores, VF50, 72 y 166. Curiosamente ambos cultivares, VF50 y 72, presentan la máxima eficiencia relativa (Tab. 3.2).

Los datos de eficiencia relativa (Fig. 3.4) indican valores distintos entre la mayoría de los genotipos, oscilando entre 0,75 y 0,90. Los genotipos VF 64 y el cultivar Alborea presentan la menor eficiencia relativa, 0.68 y 0.55 respectivamente.

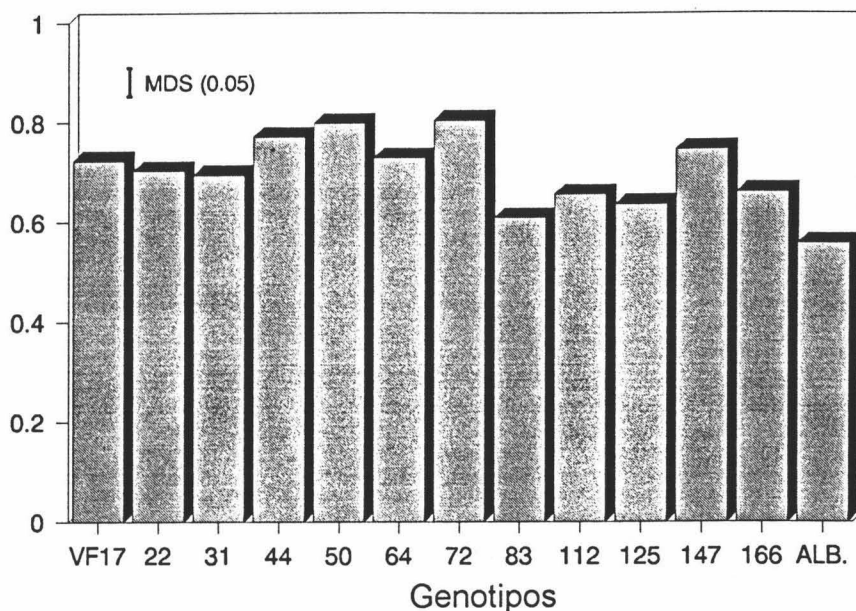


Fig. 3.8. Eficiencia relativa de la fijación de nitrógeno en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Además la ER en los nódulos de *V. faba* solo muestra una débil aunque significativa ($P < 0.05$) correlación negativa con la producción de hidrógeno.

Complementariamente se aporta la tabla 3.2 que expresa en números los datos expuestos en los diagramas anteriores, relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno, con las mínimas diferencias significativas (MDS) para $P < 0.05$. Los datos son media de seis repeticiones y proceden de al menos dos experimentos distintos con cada genotipo.

3.3 Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en los nódulos.

La actividad sacarosa sintasa (Fig. 3.9) exhibió un amplio margen de variabilidad, entre 65 y 175 lo que equivale a una variación del 37 al 100%. Los máximos los presentaron los genotipos VF17, 31 y 147, correspondiendo los mínimos a VF50, Alborea y VF112. Presenta correlación significativa positiva con la 6PGDH, la invertasa alcalina y el contenido de proteína soluble en los nódulos. No presenta correlación significativa con los parámetros relacionados con el crecimiento (Tab. 3.7) ni con el contenido de nutrientes de parte aérea o raíz (Tab. 3.8).

En la figura 3.9 se representan los datos de la actividad invertasa alcalina, que muestran una enorme variabilidad, entre 10 y 206, equivalente a un rango de 5 a 100, mucho mayor que en el experimento anterior. En VF17 presenta un valor superior al de la SS. En otros genotipos el nivel de actividad es inferior en menos de un 25% al de la SS, como VF72, 83 y 112. En VF125 la diferencia llega a ser del orden del 90%. El coeficiente de correlación positivo entre ambas actividades es mucho más bajo que en el experimento anterior en el que se utilizó un solo cultivar con diferentes cepas. Todo ello evidencia la mayor influencia del genotipo de la planta en estas actividades enzimáticas en los nódulos. No existe correlación de esta actividad con las demás enzimas estudiadas. Salvo una correlación positiva con el contenido de N en parte aérea (Tab. 3.9), no se encontraron correlaciones significativas con los parámetros de crecimiento y de fijación de nitrógeno (Tab. 3.7).

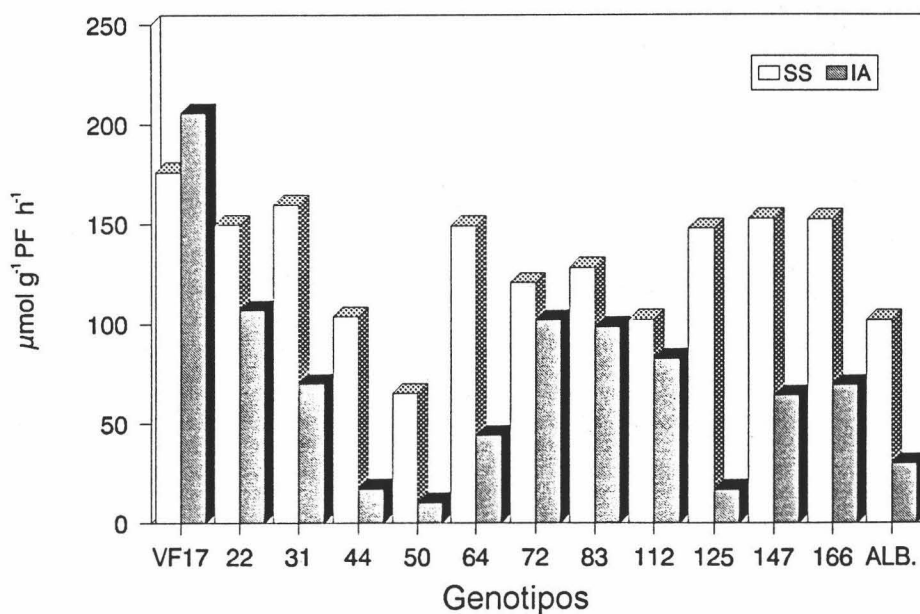


Fig. 3.9. Actividad sacarosa sintasa (SS), expresada en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, y actividad invertasa alcalina (IA), expresada en $\mu\text{mol glucosa g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) SS, 6; IA, 4.

La actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig 3.10) alcanzó valores comprendidos entre 278 y 381, mostrando por tanto unas variaciones que no fueron tan espectaculares como las descritas en la sintasa y la invertasa. La mayor actividad

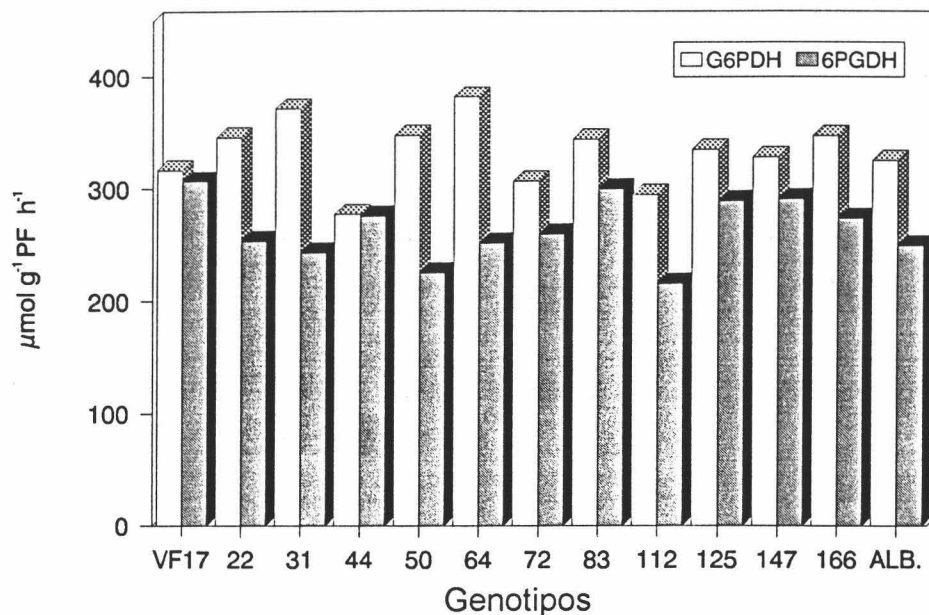


Fig. 3.10. Actividad Glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) y 6-P-gluconato deshidrogenasa (6PGDH) expresadas en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} (\text{g PF})^{-1} \text{h}^{-1}$, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) G6PDH, 14; 6PGDH, 13.

se encuentra en VF64, 31 y 50, mientras que la menor en VF44, 112 y 72. No presenta correlación con otros parámetros estudiados, a excepción de una correlación negativa escasamente significativa con ARAP, siendo destacable la no existencia de correlación entre esta actividad y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, con la que se encontró correlación en los experimentos anteriores.

En el diagrama de barras de la figura 3.10 se puede apreciar la variación de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa que alcanza valores entre 217 y 306, lo que supone un comportamiento similar a la G6PDH, obteniéndose valores más bajos que la G6PDH, al igual que en los experimentos anteriores. Los rangos de oscilación fueron similares al experimento anterior pero en este experimento la diferencia entre ambas fue mucho más variable. Así, en algunos genotipos no hay prácticamente diferencia, como VF44 y 17, mientras que en otros la diferencia fue grande, en torno a un 35%, como en VF31, 50 y 64. Esto, junto a la falta de correlación con la G6PDH ya comentada, parece indicar que estas actividades enzimáticas en los nódulos están determinadas fundamentalmente por el genotipo de la planta. Presentó una correlación positiva significativa solamente con la MDH, no encontrándose correlación alguna con

otros parámetros o actividades enzimáticas.

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (Fig. 3.11) detectada en los genotipos estudiados implica un nivel máximo de $755 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ (100%), a un mínimo de 426 (56%). La mayor actividad la presentaron VF147, 166 y 112, mientras que la menor fue la de VF50, 72 y 44. Tampoco en este experimento se encontró correlación entre esta actividad enzimática y los parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno. No se observa correlación con las otras actividades enzimáticas del metabolismo carbonado. Presenta una correlación negativa significativa con todos los parámetros de peso seco (Tab. 3.7). También se observa correlación significativa positiva con el contenido en K en parte aérea y negativa con el calcio en raíz (Tab. 3.9).

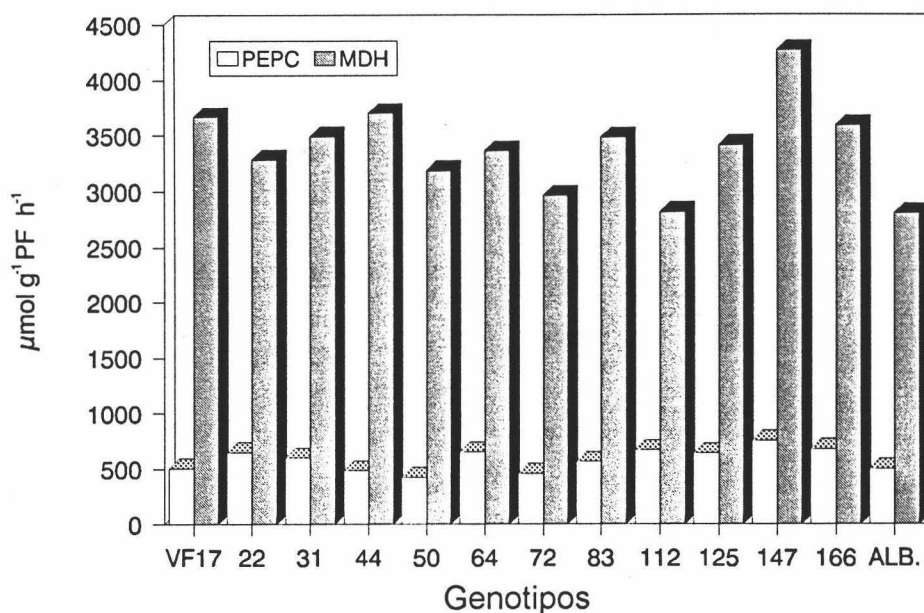


Fig. 3.11. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresada en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1})$ y actividad malato deshidrogenasa (MDH) expresada en $\mu\text{mol NAD}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) PEPC, 25; MDH, 127.

Igual que en los experimentos anteriores, la actividad malato deshidrogenasa (Fig. 3.11) presenta valores mucho más altos que la PEPC, del orden de 4 a 8 veces superiores. Oscila entre 2803 y 4269 lo que significa que la actividad más baja que se

obtiene representa el 66% de la máxima, correspondiendo los máximos a VF147, 44 y 17 y los mínimos a Alborea, VF112 y 72. Se observan coeficientes de correlación significativos y positivos entre esta actividad, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y el contenido en proteína soluble (Tab. 3.7). No se ha encontrado correlación entre esta actividad y los parámetros de la fijación de nitrógeno, crecimiento (Tab. 3.7) o contenido de nutrientes (Tab. 3.9).

Los valores de la actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH, fig. 3.8) van de 301 a 525. Estos valores extremos guardan una relación similar a la detectada en las otras enzimas del metabolismo carbonado comentadas. La actividad más baja la presenta VF112 y 64. Con el valor más alto destaca la línea VF166 y, algo más bajos, 125 y 44. No se observa ninguna correlación significativa con otros parámetros.

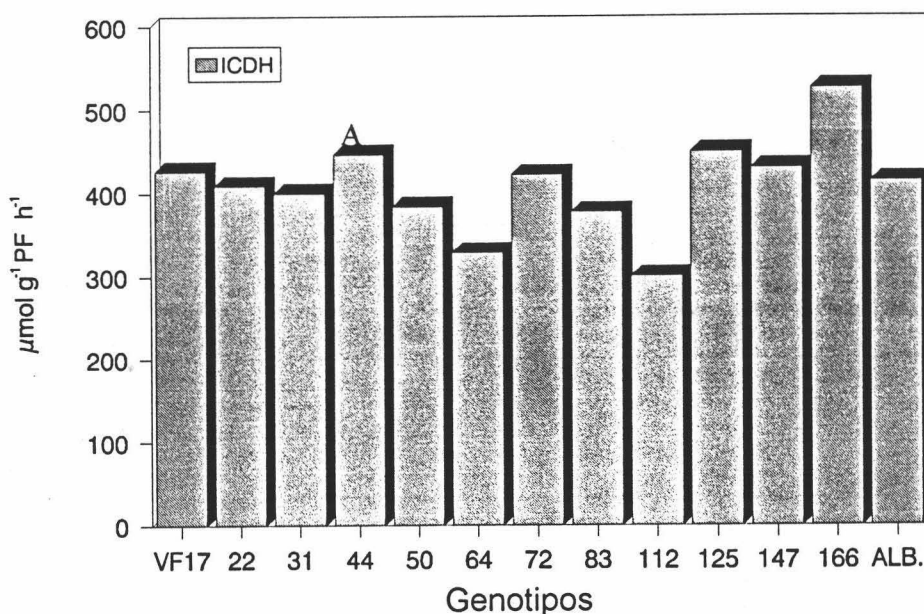


Fig. 3.12. Actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH) expresada en $\mu\text{mol NADP}_{\text{red}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de 13 genotipos de *Vicia faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. MDS ($P \leq 0.05$) 23.

En la tabla 3.3 se recoge un resumen de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado estudiadas. Todos los valores de las actividades enzimáticas

en este apartado se expresan en micromoles de sustrato transformado por gramo de peso fresco y por hora.

El contenido de proteínas (Tab. 3.4) establece como valor mínimo 15 y máximo 20 mg g⁻¹ PF, con pocas diferencias significativas. Entre 14.9 y 15.6, sin diferencias significativas, se situaron siete genotipos. Los que tuvieron mayor contenido de proteína fueron VF17, 147 y 166.

En la tabla 3.4 se exponen los datos de contenido de proteína soluble de los nódulos, así como las actividades enzimáticas expresadas en función del contenido de proteína. Estos resultados fueron muy similares a los de las actividades específicas ya comentados, dada la poca variabilidad en el contenido de proteínas. Los datos de ambas tablas son media de cuatro repeticiones procedentes de al menos dos experimentos con cada cultivar. Se dan también las mínimas diferencias significativas para $P \leq 0.05$.

Tabla 3.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado nodular, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h⁻¹, en plantas de 12 líneas puras y el cultivar Aborea de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

Genotipo	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
VF17	176g	206j	317cd	307f	506c	3667h	426ef	20.5e
VF22	150e	107i	346f	254bc	650fg	3285cd	409de	15.0a
VF31	160f	70f	371g	244b	603e	3491fg	400cd	17.5c
VF44	104b	17b	278a	276d	485bc	3704h	446f	14.9a
VF50	65a	10a	347f	226a	426a	3186c	384c	15.6a
VF64	149e	44d	381g	252bc	653fg	3362de	329b	19.1d
VF72	121c	102h	307bc	260c	462b	2963b	422e	15.6a
VF83	128d	99h	344f	300ef	568d	3484efg	378c	15.0a
VF112	102b	83g	295b	216a	672gh	2815a	301a	15.1a
VF125	148e	17b	335ef	289e	643f	3410def	450g	16.5b
VF147	153e	64e	328de	291e	755i	4269i	430efg	19.6d
VF166	152e	69f	347f	274d	680h	3588gh	526h	19.3d
ALBOREA	102b	30c	325de	250bc	501c	2804a	414d	15.4a
MDS (0.05)	6	4	14	13	25	127	23	0.7

*a-j: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$, según un test de mínimas diferencias significativas.

3.4. Determinaciones analíticas.

Los resultados de las determinaciones de N, K, Ca y Mg en raíz y parte aérea, expresados como tanto por ciento de peso seco o en miligramos por planta, se exponen en las tablas 3.5 y 3.6 respectivamente.

El genotipo de la planta influye en la acumulación de nutrientes en los órganos vegetativos de *Vicia faba*. El contenido de N, K y Mg en parte aérea presenta el mismo porcentaje de cambio (60-100) mientras que el del calcio es más amplio (40-100). En raíz se pueden describir rangos de variación distintos para cada nutriente estudiado

Tabla 3.4. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado expresadas en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} y contenido en proteína soluble, en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PF, en doce líneas puras y el cultivar Alborea de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

Genotipo	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH
VF17	143 ^d	167 ^k	258 ^a	250 ^d	412 ^a	2984 ^{ab}	347 ^{bc}
VF22	167 ^f	119 ^j	385 ^g	283 ^{ef}	724 ^h	3660 ^e	456 ^f
VF31	152 ^e	67 ^g	354 ^e	233 ^b	575 ^f	3332 ^d	382 ^d
VF44	116 ^b	19 ^b	310 ^c	308 ^g	542 ^d	4137 ^g	499 ^g
VF50	70 ^a	11 ^a	372 ^f	242 ^{cd}	456 ^b	3408 ^d	411 ^e
VF64	130 ^c	38 ^d	332 ^d	219 ^a	568 ^{ef}	2926 ^a	286 ^a
VF72	129 ^c	109 ⁱ	328 ^d	278 ^e	492 ^c	3161 ^c	450 ^f
VF83	143 ^d	110 ⁱ	383 ^f	334 ^h	632 ^g	3877 ^f	420 ^e
VF112	113 ^b	91 ^h	326 ^d	239 ^{bcd}	743 ^h	3113 ^{bc}	332 ^b
VF125	149 ^d	17 ^b	338 ^d	292 ^f	649 ^g	3445 ^d	454 ^f
VF147	130 ^c	55 ^e	280 ^b	248 ^{cd}	644 ^g	3638 ^e	367 ^{cd}
VF166	132 ^c	60 ^f	300 ^c	236 ^{bc}	587 ^f	3098 ^{bc}	454 ^f
ALBOREA	111 ^b	33 ^c	353 ^e	271 ^e	543 ^{de}	3043 ^{abc}	450 ^f
MDS(0.05)	6	4	12	13	25	129	23

*a-k: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P < 0.05$, según un test de mínimas diferencias significativas.

El contenido en N presentó pocas diferencias significativas, siendo el elemento que menos variabilidad mostró en ambos órganos. Salvo el valor máximo de VF50 en parte aérea y el mínimo de VF17, todos los demás presentan valores similares. Entre los que muestran mayor porcentaje de N en parte aérea están VF50, 72 y 166, que no coincidieron con los máximos valores de raíz, VF22, 44 y 125. Solo VF83 y 17 coincidieron con valores bajos de N tanto en raíz como en parte aérea.

Los valores extremos de K en parte aérea fueron el máximo de VF166 y el mínimo de VF72 que también fue el mínimo de raíz. Aun cuando no existen diferencias importantes en el contenido de K entre los genotipos, se puede decir que al menos en siete de ellos la acumulación de K es mayor en raíz que en parte aérea.

La mayor acumulación de Ca y Mg en raíz es generalizada en todos los genotipos (Tab. 3.5) excepto el Ca de VF22 que es mayor en parte aérea. El contenido de ambos elementos es muy diferente según los genotipos, no pudiéndose establecer pauta de comportamiento alguna entre ellos fácilmente. Sin embargo sí existe correlación positiva entre el contenido de ambos elementos en raíz ($r=0.72$ $P \leq 0.01$, tab. 3.9).

Otra correlación que se presenta es el K en parte aérea, negativamente con el Ca de raíz.

Tabla 3.5. Contenido en N, K, Ca y Mg expresado como porcentaje de peso seco, en parte aérea y raíz de plantas de 12 líneas puras y el cultivar Alborea de *V. faba*, inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

Genotipo	Parte aérea				Raíz			
	N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
VF17	3.47	4.27	0.69	0.57	3.49	5.26	1.43	1.04
VF22	4.55	5.42	1.07	0.62	4.02	5.37	0.73	1.15
VF31	4.47	5.77	0.58	0.48	3.56	5.44	0.87	0.89
VF44	4.31	4.17	1.00	0.75	4.01	5.34	1.26	0.71
VF50	5.31	4.25	0.65	0.61	3.73	5.12	1.41	0.70
VF64	4.55	5.67	0.62	0.49	3.52	5.40	0.91	0.85
VF72	4.72	3.68	0.59	0.46	3.37	4.85	1.23	1.92
VF83	4.23	4.34	0.83	0.67	3.29	5.07	1.29	0.80
VF112	4.10	5.31	0.43	0.50	3.89	4.96	1.24	1.34
VF125	4.44	4.35	0.73	0.61	4.32	5.62	0.90	1.66
VF147	4.18	5.30	0.55	0.59	3.69	5.81	0.99	1.14
VF166	4.70	6.05	0.64	0.50	3.60	5.30	0.86	0.90
ALBOREA	4.16	5.30	0.59	0.60	3.70	5.75	0.97	1.14
MDS (0.05)	0.87	0.41	0.22	0.06	0.73	0.44	0.16	0.14

Tabla 3.6. Contenido de N, K, Ca y Mg expresado en mg planta⁻¹ en parte aérea y raíz de plantas de diferentes líneas puras de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Genotipo	Parte aérea				Raíz			
	N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
VF17	134	165	27	22	36	54	15	11
VF22	67	79	16	9	22	29	4	6
VF31	75	97	10	8	19	29	5	5
VF44	174	168	40	30	56	75	18	10
VF50	679	272	41	39	74	102	28	14
VF64	68	84	9	7	17	26	4	4
VF72	132	103	16	13	32	46	12	18
VF83	154	157	30	24	40	61	16	10
VF112	62	80	6	8	18	23	6	6
VF125	53	52	9	7	24	31	5	9
VF147	59	73	8	8	20	32	6	6
VF166	192	246	26	20	54	79	13	13
ALBOREA	102	130	14	15	36	56	9	11
MDS (0.05)	44	43	7	5	14	20	5	4

Tabla 3.7. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular, en plantas de 12 líneas puras y el cultivar Alborea de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco por planta; RPA, relación raíz/parte aérea; PSN peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; H, producción de hidrógeno en aire; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; ER, eficiencia relativa; SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular.

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
PSR	1.000																	
PSPA	0.974	1.000																
PSP	0.985	0.998	1.000															
RPA	-0.279	-0.444	-0.398	1.000														
PSN	0.918	0.923	0.934	-0.245	1.000													
PNN	-0.171	-0.214	-0.188	0.653	0.130	1.000												
H	-0.514	-0.557	-0.550	0.204	-0.557	0.009	1.000											
ARA	-0.626	-0.590	-0.593	0.110	-0.405	0.408	0.561	1.000										
ARAP	0.445	0.440	0.458	-0.051	0.681	0.432	-0.147	0.288	1.000									
ER	0.187	0.272	0.259	-0.160	0.388	0.278	-0.818	-0.018	0.292	1.000								
SS	-0.535	-0.487	-0.512	0.073	-0.551	-0.030	0.155	0.358	-0.207	-0.025	1.000							
IA	-0.179	-0.029	-0.079	-0.485	-0.186	-0.222	0.054	0.251	-0.022	0.044	0.564	1.000						
G6PDH	-0.146	-0.131	-0.146	-0.135	-0.311	-0.431	0.028	-0.134	-0.581	-0.095	0.356	-0.092	1.000					
6PGDH	0.031	0.015	0.012	0.213	0.010	0.085	-0.167	-0.123	0.166	-0.041	0.581	0.383	-0.094	1.000				
PEPC	-0.635	-0.676	-0.675	0.452	-0.617	0.323	0.310	0.339	-0.384	-0.168	0.546	0.008	0.295	0.105	1.000			
MDH	0.004	0.008	0.008	0.214	0.133	0.393	-0.334	0.049	0.260	0.325	0.531	0.115	0.098	0.673	0.399	1.000		
ICDH	0.361	0.248	0.274	0.413	0.262	0.174	-0.156	-0.156	0.307	0.032	0.301	-0.013	-0.097	0.531	-0.008	0.434	1.000	
PRT	-0.139	-0.071	-0.101	-0.179	-0.207	-0.247	-0.215	-0.073	-0.217	0.169	0.700	0.371	0.350	0.421	0.391	0.600	0.281	1.000

Valor crítico			
P ≤	0.05	0.01	0.001
	0.553	0.684	0.801

Tabla 3.8. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y el contenido en N, K, Na, Ca y Mg de raíz y parte aérea, de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con 12 cepas diferentes de *R. leguminosarum*. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco de planta completa; RPA, relación de peso seco de raíz/parte aérea; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; H, producción de hidrógeno; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, actividad reductora de acetileno por planta; ER, eficiencia relativa; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz.

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r
PSR	1.000																	
PSPA	0.974	1.000																
PSP	0.985	0.998	1.000															
RPA	-0.279	-0.444	-0.398	1.000														
PSN	0.918	0.923	0.934	-0.245	1.000													
PNN	-0.171	-0.214	-0.188	0.653	0.130	1.000												
H	-0.514	-0.557	-0.550	0.204	-0.557	0.009	1.000											
ARA	-0.626	-0.590	-0.593	0.110	-0.405	0.408	0.561	1.000										
ARAP	0.445	0.440	0.458	-0.051	0.681	0.432	-0.147	0.288	1.000									
ER	0.187	0.272	0.259	-0.160	0.388	0.278	-0.818	-0.018	0.292	1.000								
N	0.411	0.336	0.361	0.109	0.336	-0.022	-0.437	-0.375	-0.118	0.373	1.000							
K	-0.379	-0.416	-0.415	0.066	-0.460	-0.088	0.529	0.368	-0.300	-0.369	0.009	1.000						
Ca	0.183	0.150	0.169	0.233	0.326	0.405	0.050	0.362	0.613	0.102	0.041	-0.238	1.000					
Mg	0.359	0.302	0.331	0.313	0.521	0.496	0.029	0.033	0.638	-0.093	-0.122	-0.397	0.718	1.000				
N _r	-0.200	-0.271	-0.241	0.725	-0.013	0.746	0.259	0.309	0.218	-0.019	0.075	0.016	0.323	0.387	1.000			
K _r	-0.313	-0.402	-0.378	0.560	-0.323	0.231	0.398	0.190	-0.109	-0.358	-0.208	0.416	0.034	0.235	0.370	1.000		
Ca _r	0.542	0.652	0.629	-0.548	0.619	-0.134	-0.501	-0.439	0.328	0.288	-0.165	-0.723	-0.109	0.240	-0.314	-0.573	1.000	
Mg _r	-0.452	-0.480	-0.478	0.383	-0.512	0.086	0.041	0.030	-0.408	0.031	-0.071	-0.303	-0.264	-0.387	0.186	-0.122	-0.118	1.000

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01 0.001
0.553 0.684 0.801

Tabla 3.9. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular y el contenido en N, K, Na, Ca y Mg en parte aérea y raíz, en plantas de 12 líneas puras y el cultivar Alborea de *Vicia faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*. Variables: SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz.

	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r
SS	1.000															
IA	0.564	1.000														
G6PDH	0.356	-0.092	1.000													
6PGDH	0.581	0.383	-0.094	1.000												
PEPC	0.546	0.008	0.295	0.105	1.000											
MDH	0.531	0.115	0.098	0.673	0.399	1.000										
ICDH	0.301	-0.013	-0.097	0.531	-0.008	0.434	1.000									
PRT	0.700	0.371	0.350	0.421	0.391	0.600	0.281	1.000								
N	-0.484	-0.611	0.363	-0.504	-0.174	-0.224	0.063	-0.312	1.000							
K	0.346	-0.103	0.527	-0.299	0.692	0.085	-0.022	0.350	0.009	1.000						
Ca	0.065	0.019	-0.088	0.338	-0.170	0.218	0.281	-0.342	0.041	-0.238	1.000					
Mg	-0.288	-0.242	-0.363	0.379	-0.252	0.296	0.176	-0.397	-0.122	-0.397	0.718	1.000				
N _r	-0.132	-0.454	-0.266	-0.134	0.216	-0.023	0.124	-0.300	0.075	0.016	0.323	0.387	1.000			
K _r	0.319	-0.332	0.239	0.268	0.398	0.435	0.314	0.332	-0.208	0.416	0.034	0.235	0.370	1.000		
Ca _r	-0.457	0.253	-0.512	0.081	-0.643	-0.082	-0.241	-0.133	-0.165	-0.723	-0.109	0.240	-0.314	-0.573	1.000	
Mg _r	0.110	0.147	-0.306	0.015	0.070	-0.348	0.044	-0.140	-0.071	-0.303	-0.264	-0.387	0.186	-0.122	-0.118	1.000

Valor crítico			
P _≤	0.05	0.01	0.001
	0.553	0.684	0.801

4. Influencia del nitrato y su interacción con la fijación de nitrógeno.

En este experimento se ha estudiado el efecto de la aplicación de nitrato sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo, la fijación de nitrógeno y el metabolismo carbonado de los nódulos.

El experimento fue realizado con dos leguminosas, *Vicia faba* cv. Alborea, inoculado con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *Phaseolus vulgaris* var. Contender inoculado con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a fin de comparar el efecto del nitrato sobre dos especies de leguminosas con distinta tolerancia al nitrato.

La aplicación del nitrato determinó dos tipos de experimentos distintos:

Tratamiento A Se adicionó 8 mM de nitrato desde la siembra.

Tratamiento B Se adicionó 2 mM desde la siembra aumentando hasta 8 mM de nitrato una semana antes de la aparición de los botones florales (final del crecimiento vegetativo).

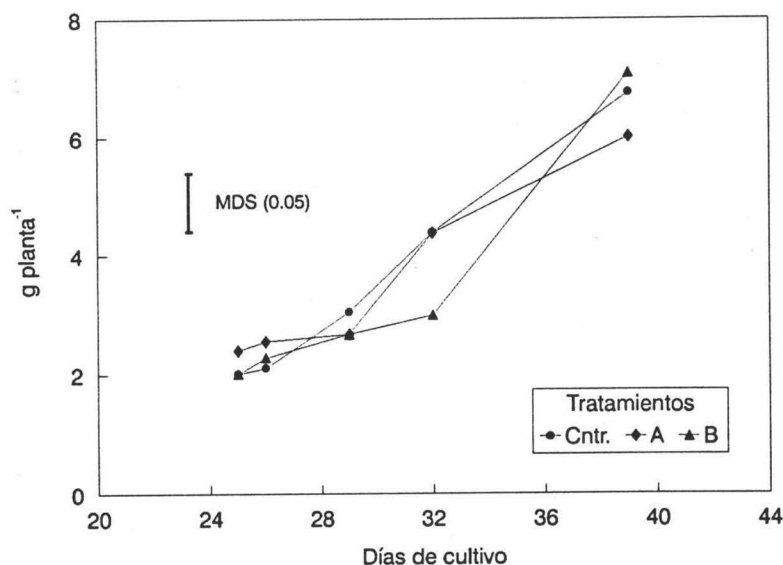


Fig. 4.1. Peso seco de planta, expresado en g planta^{-1} , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM de KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

Como control se utilizaron plantas a las que se suministró 2 mM de nitrato durante todo el período de cultivo. Las recogidas se iniciaron en ambos tipos de tratamiento (A y B) al final del crecimiento vegetativo y finalizaron al inicio de fructificación, los días que a continuación se especifican:

Habas: los días 25, 26, 29, 32 y 39 de cultivo.

Judías: los días 19, 20, 24, 28 y 34 de cultivo.

4.1. Resultados obtenidos con habas.

4.1.1. Análisis del crecimiento.

Los resultados de PSR, PSPA y PSP (Fig. 4.1) presentaron una evolución parecida a la observada en la ontogenia (primer experimento) y se correlacionaron positiva y significativamente entre sí con coeficientes superiores a 0.95 (Tab. 4.6).

La relación de peso seco de raíz/parte aérea (Fig. 4.2) disminuyó con el tiempo. En el tratamiento A los valores de RPA son inferiores al control en las tres

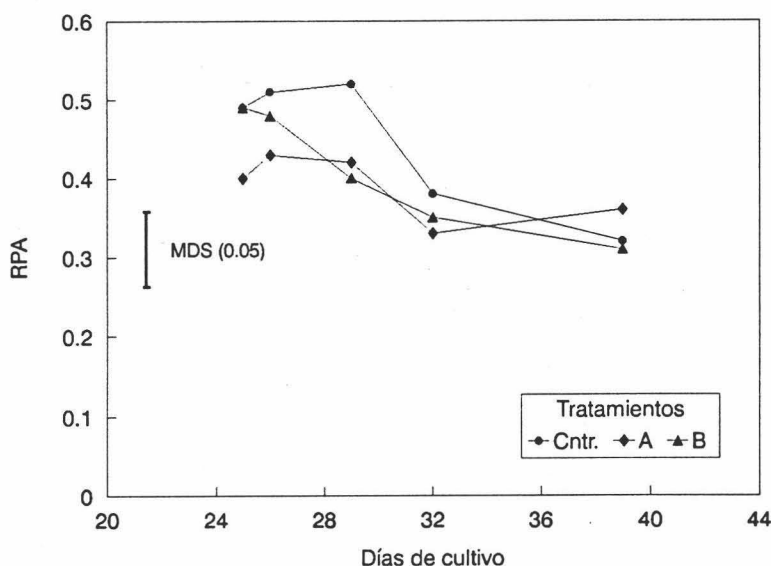


Fig. 4.2. Relación de peso seco de raíz/parte aérea en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM de KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

primeras recogidas aunque las diferencias son escasamente significativas. En el tratamiento B, a los tres días de aplicación del nitrato se apreció un descenso significativo respecto al control, pero esa diferencia desaparece en las últimas recogidas.

En la tabla 4.1 se recogen los resultados de los parámetros de crecimiento estudiados, que son media de seis repeticiones procedentes de al menos dos ensayos con cada tratamiento, junto con las mínimas diferencias significativas a $P \leq 0.05$.

Tabla 4.1. Parámetros de crecimiento de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* crecidas con 8 mM KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO_3 . Peso seco de raíz (PSR) parte aérea (PSPA) y planta completa (PSP) expresados en g planta⁻¹; relación raíz/parte aérea (RPA).

Días	TTO.	PSR	PSPA	PSP	RPA
25	control	0,61ab	1.3ab	2.0a	0.49ef
	A	0,66abc	1.7ab	2.4a	0.40abcde
	B	0,55a	1.2a	2.0a	0.49ef
26	control	0,61ab	1.4ab	2.1a	0.51f
	A	0,68abc	1.8ab	2.5a	0.43cdef
	B	0,63abc	1.6ab	2.3a	0.48def
29	control	0,92bc	2.0ab	3.1a	0.52f
	A	0,72abc	1.9ab	2.7a	0.42bcdef
	B	0,68ab	1.9ab	2.7a	0.40abcde
32	control	0,96c	3.3C	4.4b	0.38abcd
	A	0,92bc	3.4c	4.4b	0.33abc
	B	0,70abc	2.2b	3.0a	0.35abc
39	control	1,32d	5.1de	6.8c	0.32ab
	A	1,46d	4.4d	6.0c	0.36abc
	B	1,40d	5.5e	7.1c	0.31a
MDS (0.05)		0,34	0.9	1.1	0.10

*a-f: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

4.1.2 . Fijación de nitrógeno.

La evolución del PSN (Fig. 4.3) se afectó por los tratamientos con nitrato, presentando diferencias significativas con el control. El desarrollo de la masa nodular en el tratamiento A es mucho menor que en las plantas control, valores del orden del 50% inferiores, mientras que en el tratamiento B el crecimiento de la masa nodular quedó prácticamente detenido a partir de las 24 horas de la aplicación del nitrato. El crecimiento se recuperó en las dos ultimas recogidas pero con valores significativamente inferiores a los del control. Se obtuvieron coeficientes de correlación positivos y significativos entre PSN y los demás parámetros de peso seco, aunque inferiores a los obtenidos para PSR, PSPA y PSP entre sí, lo que evidencia el diferente comportamiento de PSN respecto a los otros parámetros de crecimiento estudiados, así como su idoneidad para la evaluación de la fijación de nitrógeno más que para el estudio del crecimiento de la planta.

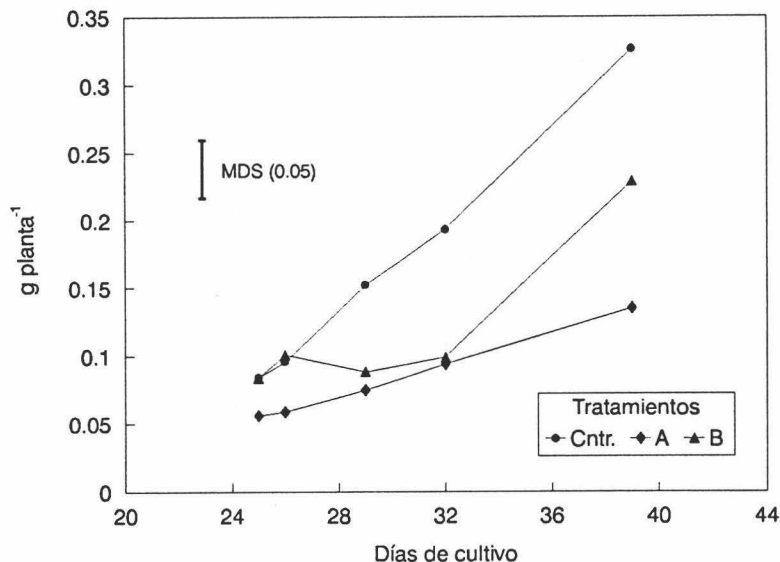


Fig. 4.3. Peso seco de nódulos en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM de KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

La actividad reductora de acetileno específica (ARA) en las plantas control va descendiendo a lo largo de los muestreos realizados (Fig. 4.4). Las plantas tratadas con

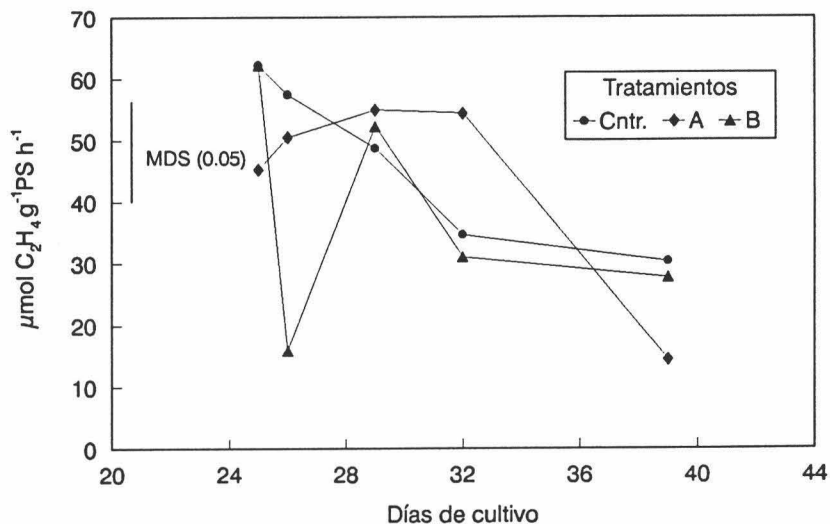


Fig. 4.4. Actividad reductora de acetileno, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B). Control con 2 mM.

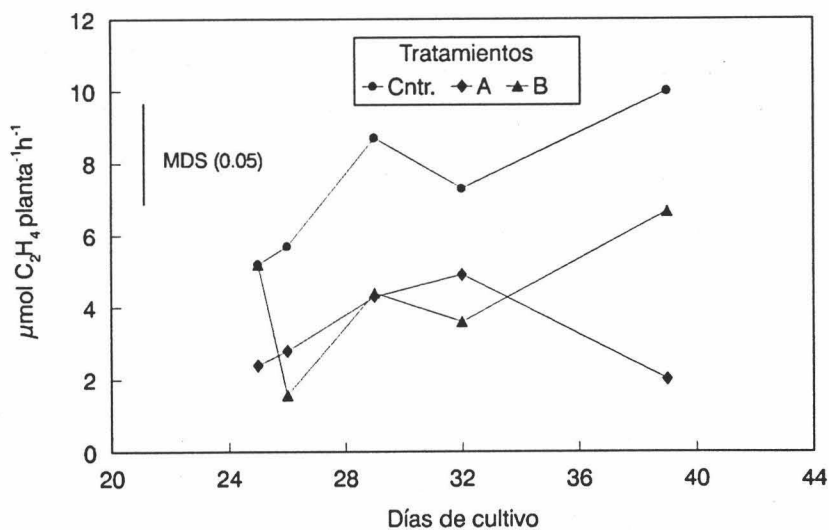


Fig. 4.5. Actividad reductora de acetileno total por planta, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

8 mM de nitrato desde el inicio mostraron un ligero incremento de ARA hasta la cuarta recogida, seguido de un fuerte descenso en la última hasta valores inferiores a los de las plantas control. Se puede pensar que el máximo de ARA, que en el control se alcanza hacia el día 18 de cultivo (experimento 1), en las plantas adaptadas al nitrato este máximo se retarda. El tratamiento B provocó una brusca caída de ARA a las 24 horas del aumento de nitrato en la solución nutritiva, seguida de una recuperación de esta actividad hasta niveles similares a las plantas control, presentando una evolución paralela en los tres últimos muestreos.

Resulta interesante estudiar el comportamiento de la ARAP (Fig. 4.5), parámetro en el que se combinan el comportamiento de la ARA específica con el de la masa nodular. En las plantas control ARAP va aumentando como se determinó en el estudio de la ontogenia de cultivo. Las plantas con nitrato desde el inicio presentan una actividad por planta algo más baja aunque las diferencias no son significativas hasta la última recogida en la que se observa un descenso muy acusado. La caída de este parámetro es debida a una drástica disminución en la actividad ARA específica.

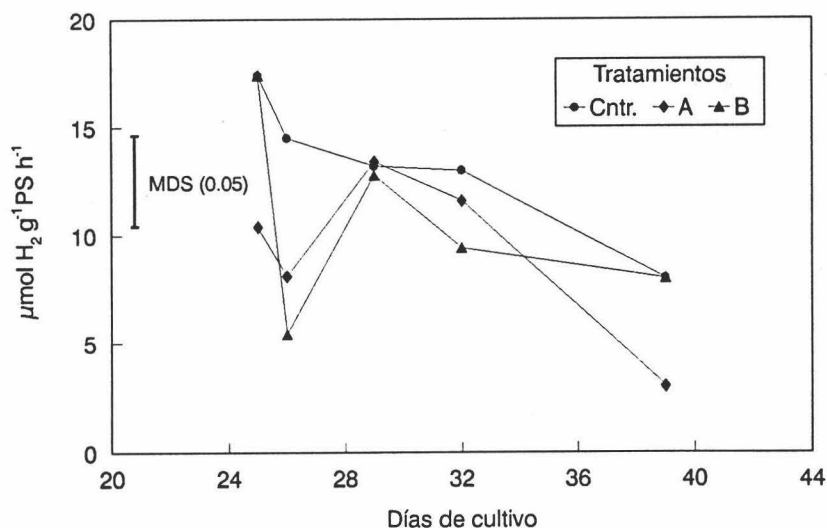


Fig. 4.6. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa, expresada en $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

Las plantas tratadas con 8 mM de nitrato a partir del día 25 muestran un fuerte descenso de ARAP en las primeras 24 horas. En las siguientes recogidas se observa un perfil de ARAP casi paralelo a las plantas control pero a un nivel significativamente más bajo que estas. En la primera recogida, a las veinticuatro horas del aumento de nitrato en la solución nutritiva, la caída de ARAP respecto al control se debe al fuerte descenso de la ARA específica. A partir de la segunda recogida, el nivel de ARA específica se recupera, pero la masa nodular ha descendido respecto al control, lo que se refleja en la ARA total por planta.

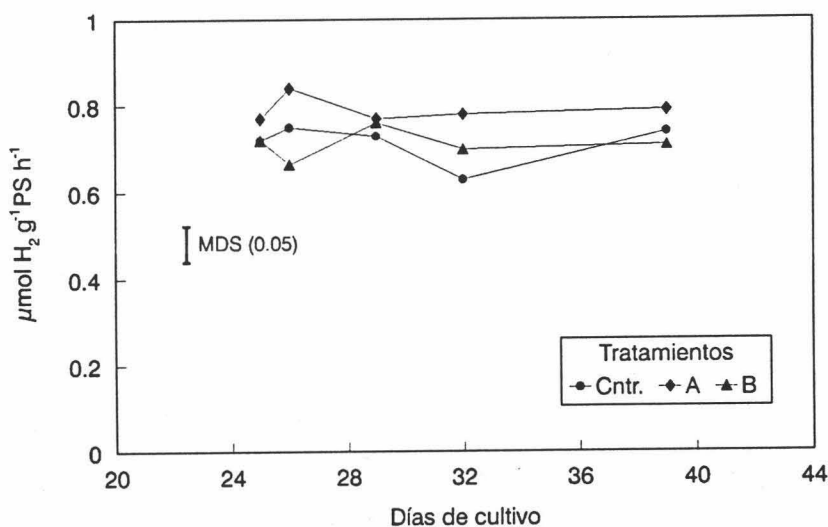


Fig. 4.7. Eficiencia relativa en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO₃ desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

La evolución del hidrógeno producido por la nitrogenasa (Fig. 4.6) es concordante con la actividad ARA, obteniéndose como en otros experimentos una correlación alta entre ambos parámetros (Tab. 4.3).

La eficiencia relativa (Fig. 4.7) apenas se afectó con la presencia de nitrato en la solución nutritiva, ya que presentó pocas diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento A mostró valores más altos de ER sin diferencias significativas respecto al control, a excepción del día 32 que sí fue significativa. En el tratamiento B se apreció un ligero descenso de la ER a las 24 horas con una diferencia

no significativa respecto al control pero sí respecto al tratamiento A. En los demás muestreos no se apreciaron diferencias significativas.

Los resultados de los parámetros de fijación de nitrógeno estudiados se exponen en la tabla 4.2, junto con las mínimas diferencias significativas para $P \leq 0.05$. Estos datos son media de seis repeticiones, representativas de al menos dos ensayos con cada tratamiento.

Tabla 4.2. Parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, en plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* crecidas con 8 mM KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO_3 . Producción de hidrógeno (H); actividad reductora de acetileno específica (ARA) y total por planta (ARAP); eficiencia relativa (ER); peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹; peso normalizado de nódulos (PNN).

Días	TTO.	H	ARA	ER	ARAP	PSN	PNN
25	control	17.4 f	62.2 e	0.72 abc	5.2 abc	0.08 a	67 d
	A	10.4 bcde	45.3 bcde	0.77 bcd	2.4 a	0.06 a	34 ab
	B	17.4 f	62.2 e	0.72 abc	5.2 abc	0.08 a	67 d
26	control	12.3 cdef	43.8 bcde	0.73 bc	4.2 ab	0.10 abc	69 d
	A	7.1 abc	44.6 bcde	0.84 d	2.8 a	0.06 a	34 ab
	B	5.4 ab	15.9 a	0.70 ab	1.6 a	0.10 abc	66 d
29	control	14.5 ef	57.5 de	0.75 bcd	8.7 cd	0.15 c	76 d
	A	13.4 def	55.0 de	0.77 bcd	4.3 ab	0.08 a	42 abc
	B	12.8 def	52.4 de	0.75 bcd	4.4 ab	0.09 ab	47 c
32	control	13.0 def	34.7 abcd	0.63 a	7.0 bc	0.21 d	69 d
	A	11.6 cde	54.5 de	0.78 bcd	5.1 abc	0.09 a	30 a
	B	9.4 bcde	31.0 abc	0.74 bc	3.6 ab	0.10 abc	44 bc
39	control	8.0 abcd	30.4 abc	0.74 bc	10.7 d	0.33 e	64 d
	A	3.0 a	14.4 a	0.80 cd	1.9 a	0.14 bc	32 ab
	B	8.0 abcd	27.8 ab	0.71 abc	6.7 bc	0.23 d	42 abc
MDS (0.05)		5.2	22.9	0.09	3.6	0.05	12

*a-f: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

4.1.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.

La actividad sacarosa sintasa (Fig. 4.8) se ve alterada por el nitrato del medio, pues existen diferencias significativas entre tratamientos. Así, en el tratamiento A se obtienen valores superiores al control en las cuatro primeras recogidas descendiendo en la última, mientras que esta actividad se recupera en el control. Sin embargo en el tratamiento B se produce un ligero aumento de la actividad respecto al control, que es significativo en el día 29, siguiendo una caída aun más drástica que la del tratamiento A, alcanzando un nivel mínimo en el día 32 (3^{er} muestreo) que se mantiene (4^o muestreo). Este descenso de la sacarosa sintasa se podría relacionar en principio con la disminución de la ARA y con menor crecimiento de la masa nodular. Esta actividad enzimática se correlaciona positivamente con la RPA, con las actividades IA, G6PDH, 6PGDH, PEPC (Tab. 4.7) y con el contenido de nitrógeno de la raíz (Tab. 4.9); negativamente con PSR, PSPA y PSP (Tab. 4.7).

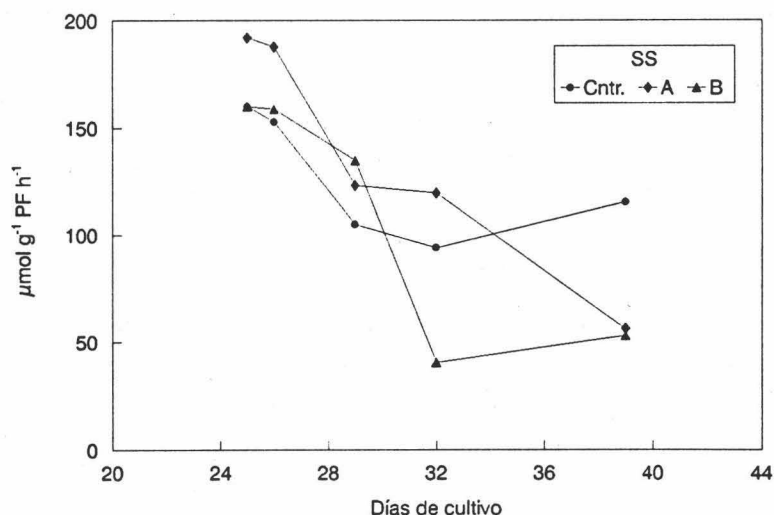


Fig. 4.8. Actividad sacarosa sintasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

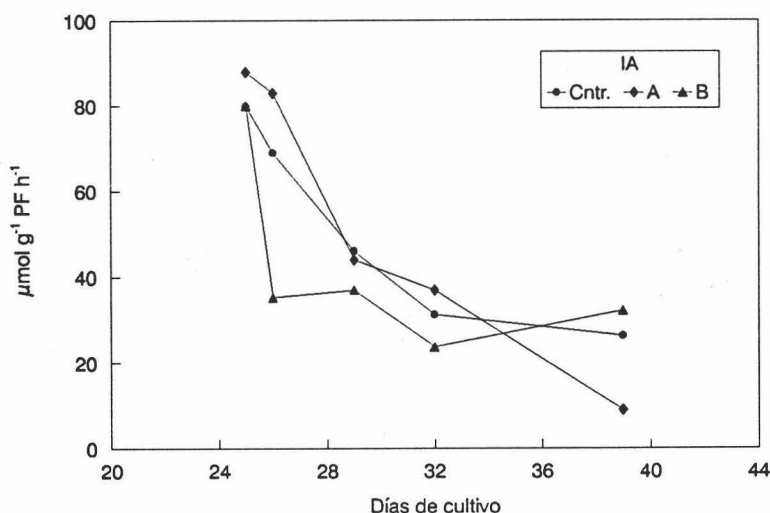


Fig. 4.9. Actividad invertasa alcalina, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

La invertasa alcalina (Fig. 4.9) con el tratamiento A tiene un nivel más alto que el control en los dos primeros muestreos descendiendo como la SS en el último muestreo. En el tratamiento B hay una caída brusca de la actividad a las 24 horas, asociada con la disminución de ARA ya comentada, recuperando niveles similares al control en las últimas recogidas. Parece que el nivel alto de nitrato desde el inicio provoca el descenso de ambas actividades enzimáticas lo que junto con la disminución de la ARA y ARAP se podría interpretar como un adelanto de la senescencia. Esta enzima presenta una correlación positiva con ARA (Tab. 4.7).

El comportamiento de las dos enzimas que hidrolizan la sacarosa es similar con el tratamiento A, con niveles superiores al control en las primeras recogidas e inferiores en las últimas. En cambio, en el tratamiento B siguen una evolución diferente, aumentando la SS en las primeras recogidas y disminuyendo en las últimas mientras que la IA cae bruscamente en la primera y se recupera algo en la última.

La glucosa-6-P deshidrogenasa (Fig. 4.10) mostró valores superiores al control en los dos primeros muestreos (tratamiento A) y tras un brusco descenso entre los días 26 y 29, se mantuvo en niveles inferiores al control hasta el final con el valor mínimo en la última recogida. Con el tratamiento B se observó un aumento significativo a las

veinticuatro horas, pero la actividad descendió por debajo del control en los siguientes muestreos aunque, como el control, aumentó en la última recogida.

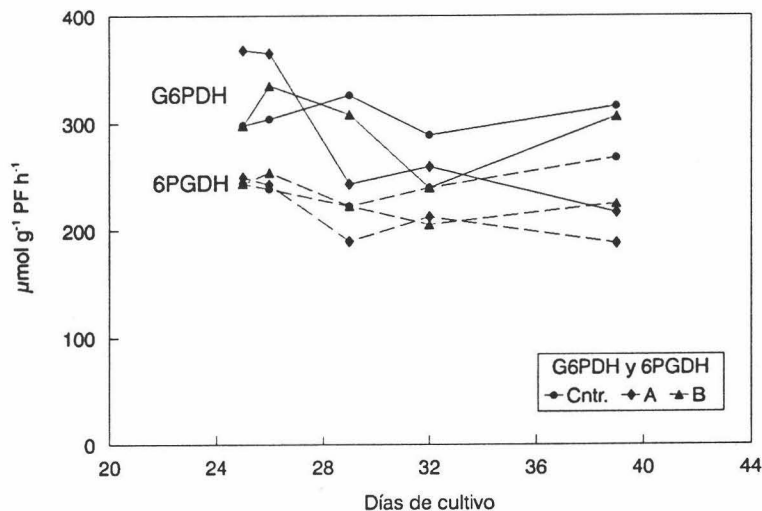


Fig. 4.10. Actividades glucosa-6-P deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B). Control con 2 mM.

En la figura 4.10 se aprecia la evolución de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa semejante a la glucosa-6-P deshidrogenasa con valores en ambos tratamientos que en ningún caso fueron significativamente superiores al control. En el tratamiento B también se encontró un incremento de actividad a las 24 horas aunque no fue tan pronunciado como en la G6P deshidrogenasa.

Las dos actividades de la vía de las pentosas-fosfato se correlacionan positivamente entre sí (Tab. 4.7) y con otras actividades del metabolismo carbonado como SS, IA y MDH.

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (Fig. 4.11) se incrementó con el nitrato en el medio. Así, cuando se suministra desde el inicio del cultivo, la actividad fue superior al control hasta el día 32 a partir del cual se produce un acusado descenso que llegó a ser inferior al control en la última recogida. Con el tratamiento B la actividad se estimula en las primeras 24 horas y luego desciende aunque se mantiene por encima del control. Esta actividad se correlacionó positivamente con la SS y MDH (Tab. 4.7), así como con el contenido de nitrógeno de la raíz (Tab. 4.9).

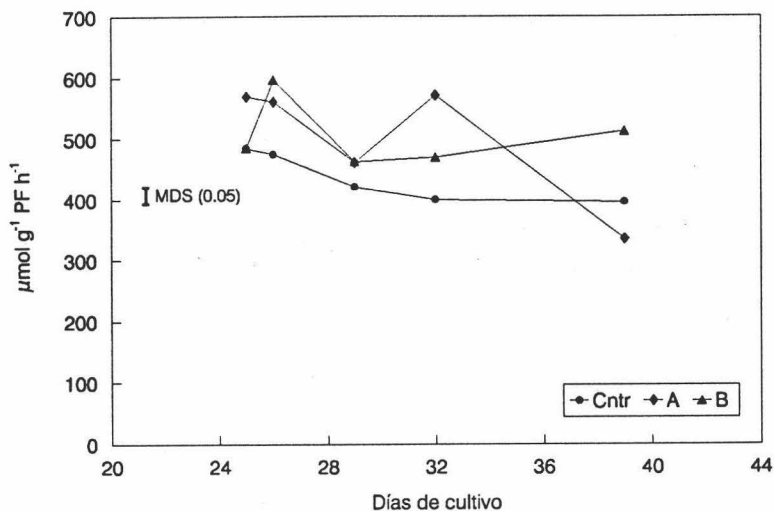


Fig. 4.11. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, en $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \text{g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en nódulos de *V. faba* inoculada con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o con 2 mM KNO_3 desde el inicio, aumentando hasta 8 mM una semana antes de la aparición de los botones florales (B). El control creció con 2 mM.

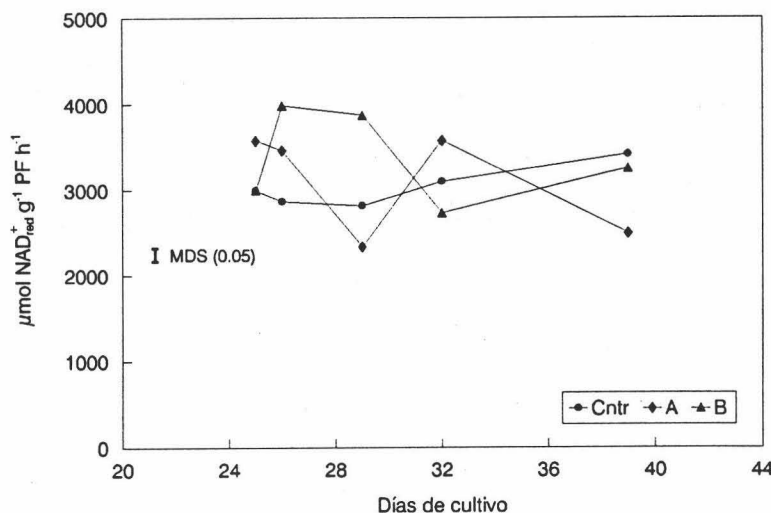


Fig. 4.12. Actividad malato deshidrogenasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o con 2 mM KNO_3 desde el inicio, aumentando hasta 8 mM una semana antes de la aparición de los botones florales (B). El control creció con 2 mM.

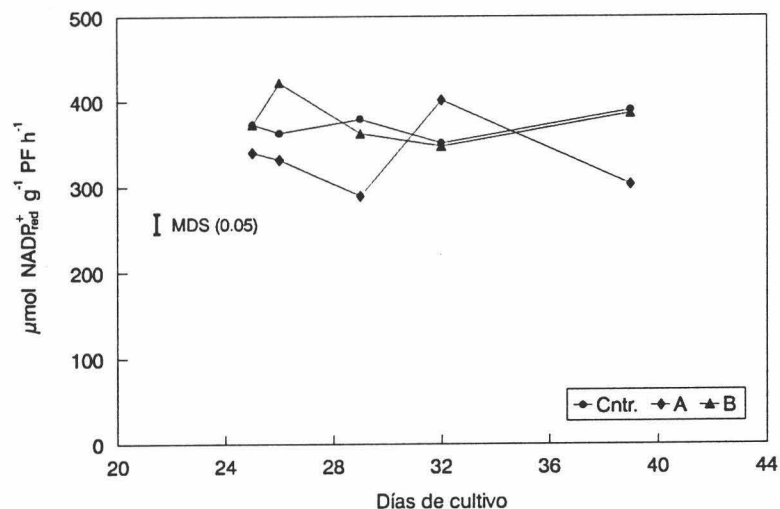


Fig. 4.13. Actividad isocitrato deshidrogenasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

En este experimento se encontraron valores de actividad malato deshidrogenasa (Fig. 4.12) entre 5 y 8 veces superiores a los de la actividad PEPC. Con el tratamiento A la actividad se incrementó en un 20% en relación al control en las dos primeras recogidas; en la tercera descendió un 17% respecto al control, en la cuarta se recuperó hasta un 29% por encima del control y descendió al final hasta un 23% por debajo del control. Con el tratamiento B la actividad se incrementa en casi un 40% a las 24 horas, manteniéndose el día 29. Desciende a partir del día 32 con niveles entre un 5 y un 12 % inferiores al control. La MDH presentó correlación positiva con la vía de las PP, la PEPC y la ICDH (Tab. 4.7).

La isocitrato deshidrogenasa (Fig. 4.13) mantiene un nivel bastante uniforme a lo largo del cultivo con oscilaciones inferiores al diez por ciento en las plantas crecidas a expensas de la fijación de nitrógeno. Con el tratamiento A mostró valores inferiores al control en casi un 10% en las dos primeras recogidas y en casi el 24% en la tercera. En la cuarta recogida, el tratamiento A superó al control en un 14%, cayendo un 22% por debajo del control en el último muestreo. Con el tratamiento B en cambio, se comportó de manera parecida a las otras actividades estudiadas, incrementándose en un 16% en relación al control a las 24 horas de la adición de

nitrito, para descender después y seguir una evolución casi igual a la del control. Esta enzima se correlacionó positivamente con la MDH (Tab. 4.7).

El contenido de proteína soluble en nódulos (Tab. 4.3) en las plantas control aumentó en las tres últimas recogidas. Los tratamientos con nitrato estimularon el contenido de proteína. El tratamiento A dio valores superiores al control en todas las recogidas salvo en la tercera. El tratamiento B también aumentó el contenido de proteínas a partir de las 24 horas de aplicación, a excepción del día 29. Este parámetro se correlacionó positivamente con el contenido de magnesio en la raíz y negativamente con la actividad nitrogenasa (H y ARA) y con la actividad IA.

En las tablas 4.3 y 4.4 se resumen los datos de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado expresadas en función del peso fresco o en función del contenido de proteína, respectivamente. Los datos son media de cuatro determinaciones representativas de al menos dos ensayos con cada tratamiento.

Tabla 4.3. Contenido de proteína soluble en nódulos, expresado en mg g^{-1} PF y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF h^{-1} , en plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* crecidas con 8 mM KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO_3 .

Días	TTO.	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
25	control	160g	80g	298de	244de	485c	2996e	373ef	11.4a
	A	192h	88i	368i	250d	569e	3579h	340bc	13.1bc
	B	160g	80g	298de	244de	485c	2996e	373ef	11.4a
26	control	153g	69f	304ef	239d	475c	2867d	363de	11.2a
	A	188h	83h	365i	243de	561e	3461g	332b	13.4cd
	B	159g	35d	335h	255d	597f	3989j	422i	16.7h
29	control	105d	46e	326gh	223c	421b	2817cd	379f	14.1e
	A	123e	44e	244b	190a	462c	2334a	289a	12.6b
	B	135f	37d	309ef	223c	463c	3871i	363de	14.4ef
32	control	94c	31c	289d	240d	400b	3100e	351cd	14.8f
	A	120e	37d	260c	213bc	571e	3579h	401h	15.3fg
	B	40a	24b	240b	205b	470c	2730c	348c	14.0de
39	control	115e	26b	316fg	268f	396b	3418g	390gh	13.1bc
	A	56b	9a	217a	188a	335a	2493b	303a	15.5g
	B	53b	32c	307ef	225c	513d	3255f	386fg	15.7g
MDS (0.05)		9	2	12	12	26	111	14	0.6

*a-i: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

Tabla 4.4. Contenido de proteína, expresado en mg g⁻¹ PF y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos, expresadas en μmol g⁻¹ PF h⁻¹, en plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B): control con 2 mM KNO₃.

Días	TTO.	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH
25	control	234gh	117j	436g	357j	709f	4380hi	545g
	A	244h	112i	468i	318h	724f	4553j	433de
	B	234gh	117j	436g	357j	709f	4380hi	545g
26	control	227g	103h	452h	355ij	706f	4264h	540g
	A	233gh	103h	453hi	302g	696f	4293h	412c
	B	158ef	35c	334c	254ede	595e	3978g	421cd
29	control	124d	54f	385e	264ef	498c	3330cd	448e
	A	164f	58g	324c	252cde	613e	3097b	384b
	B	156ef	43e	358d	258def	536d	4481ij	420cd
32	control	106c	35c	326c	271f	451b	3491e	396b
	A	130d	40d	282b	231b	621e	3888f	436de
	B	48a	28b	285b	244bcd	559d	3246c	413c
39	control	147e	33c	402f	341i	504c	4349hi	496f
	A	60b	10a	233a	202a	359a	2677a	325a
	B	56ab	34c	326c	239bc	546d	3461de	410c
MDS (0.05)		11	2	15	15	31	134	17

*a-j: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

4.1.4. Determinaciones analíticas.

El contenido de nitrógeno (Tab. 4.5) expresado como porcentaje de peso seco en parte aérea y raíz, presenta en general pocas diferencias significativas entre tratamientos, manteniendo el nivel, con algunas oscilaciones a lo largo del cultivo.

En parte aérea, el día 32 se encontró un valor significativamente superior con el tratamiento B respecto al control. El día 39 el tratamiento B dio un valor significativamente inferior al A e inferior al control aunque sin diferencia significativa con este. Este parámetro en parte aérea no presentó correlación estadísticamente significativa con los parámetros de crecimiento, fijación de nitrógeno, enzimas del metabolismo carbonado nodular ni el contenido de otros elementos.

En raíz el contenido de nitrógeno disminuye a lo largo del cultivo, presentando valores inferiores a la parte aérea, especialmente en los dos últimos muestreos. El tratamiento A produjo los valores más altos respecto al control, salvo en el día 29 en que no se encontró diferencia significativa. También produjo valores superiores al tratamiento B pero con diferencias no significativas. El nitrógeno en raíz presentó correlación positiva con SS (0.73), IA (0.62) y PEPC (0.70), así como con el contenido de Mg en parte aérea (0.70). En cambio presentó correlación negativa con PSR (0.65) PSPA (0.67) y PSP (0.68) y con parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno que incrementan a lo largo del cultivo como ARAP (-0.72) y PSN (-0.85).

El contenido de K presentó valores muy similares en parte aérea y raíz a excepción del último muestreo en que las plantas control mostraron un valor significativamente superior en la raíz, así como las sometidas al tratamiento A y B aunque en este caso las diferencias no fueron significativas.

El K en la parte aérea va descendiendo a lo largo del cultivo en las plantas control. Los tratamientos A y B también mostraron un descenso en el último muestreo. El contenido de este elemento en la parte aérea no presentó correlaciones significativas con los parámetros de crecimiento, enzimas del metabolismo carbonado nodular ni el contenido en otros elementos. Sí presentó correlación negativa con ARAP (-0.60).

En la raíz el contenido de K se mantiene a lo largo del cultivo. Solo el tratamiento A en el día 29 produjo un valor significativamente superior al control y al tratamiento B. No se encontraron correlaciones significativas.

El contenido de calcio en parte aérea presentó escasas diferencias, manteniéndose el nivel a lo largo de los muestreos realizados. A excepción del último muestreo, el tratamiento B dio los valores más altos. Presentó una correlación negativa débil con ARAP y PSN. No se obtuvieron correlaciones con otras variables.

En raíz el nivel de calcio se mantiene casi constante a lo largo del cultivo ya que el ligero aumento de las plantas control no es significativo, las sometidas al tratamiento A prácticamente no varían y las del tratamiento B suben los días 29 y 32 cayendo fuertemente en la última recogida. Las plantas control mostraron valores parecidos a la parte aérea, produciendo los tratamientos con nitrato valores más altos. Así, el tratamiento A produjo un valor superior en un 91,7% respecto al control en el día 25, disminuyendo la diferencia a lo largo del cultivo. El tratamiento B también fue superior al control salvo en la última recogida. Este tratamiento también fue superior al A en los días 29 y 32 aunque las diferencias entre ambos tratamientos no fueron

significativas. Esto parece indicar que los tratamientos con nitrato hacen aumentar el contenido de Calcio en la raíz en todo el periodo de cultivo. Este elemento en raíz se correlacionó negativa pero débilmente con ARAP y PNN, positivamente con Mg en parte aérea y no se correlacionó con el crecimiento o el metabolismo carbonado nodular.

El contenido de magnesio presentó valores superiores en parte aérea y el tratamiento con nitrato hace aumentar su concentración. En la parte aérea el contenido fue bajando en las plantas control a lo largo del cultivo. El tratamiento A mostró valores muy altos los días 25 y 26, bajando a niveles próximos al control a partir del día 29 pero manteniendo el nivel en el último muestreo, mientras que el control descendió. Las plantas sometidas al tratamiento B presentaron valores similares al control los días 25 y 26, aumentando en las tres últimas recogidas. El contenido de este elemento en la parte aérea se correlacionó negativa y débilmente con PSN y PNN, positiva y débilmente con la ER, positivamente con el N en raíz y el Ca en raíz. No se correlacionó con el crecimiento ni el metabolismo carbonado nodular.

En la raíz el contenido de Mg se mantuvo casi constante en las plantas control. Con el tratamiento A el contenido de este elemento fue superior al control aunque esa diferencia no fue significativa hasta el último muestreo. El tratamiento B produjo valores significativamente superiores respecto al control a partir del día 26. También superó al tratamiento A aunque la diferencia solo fue significativa en el último muestreo. Ambos tratamientos aumentaron el contenido de Mg en raíz de forma significativa en el último muestreo. Este elemento en raíz solo mostró una correlación positiva débil con el contenido en proteína soluble del nódulo. No se encontraron otras correlaciones con el crecimiento, fijación de nitrógeno, metabolismo carbonado ni contenido en otros elementos.

En las tablas 4.5 y 4.6 se resumen los datos de contenido de N, K, Ca y Mg en parte aérea y raíz, expresados como porcentaje o como mg por planta, respectivamente, junto con las mínimas diferencias significativas para $P \leq 0.05$.

Tabla 4.5. Contenido en N, K, Ca y Mg, expresado como porcentaje de peso seco, en raíz y parte aérea de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO₃.

Días	TTO.	PARTE AÉREA				RAÍZ			
		N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
25	control	3.54	5.48	0.13	0.32	3.04	5.19	0.12	0.22
	A	3.76	5.40	0.12	0.53	3.50	5.35	0.23	0.25
	B	3.91	5.52	0.14	0.35	3.21	5.24	0.22	0.28
26	control	3.55	5.45	0.13	0.32	3.02	5.23	0.14	0.21
	A	3.79	5.31	0.11	0.52	3.52	5.37	0.23	0.24
	B	4.00	5.57	0.14	0.34	3.35	5.32	0.20	0.33
29	control	3.24	5.20	0.12	0.30	2.91	5.01	0.14	0.22
	A	3.74	5.90	0.13	0.33	3.14	5.79	0.20	0.27
	B	3.55	5.08	0.14	0.40	3.08	5.08	0.26	0.35
32	control	3.01	4.75	0.12	0.29	2.68	4.89	0.14	0.22
	A	3.78	5.75	0.13	0.35	3.27	5.23	0.20	0.25
	B	3.58	5.38	0.14	0.34	2.84	5.39	0.26	0.34
39	control	3.82	4.05	0.10	0.24	2.50	5.53	0.16	0.21
	A	3.90	4.88	0.13	0.37	2.94	5.04	0.21	0.36
	B	3.42	4.74	0.13	0.40	2.66	5.03	0.16	0.48
MDS (0.05)		0.45	0.61	0.02	0.07	0.42	0.52	0.07	0.11

Tabla 4.6. Contenido en N, K, Ca y Mg, expresado en mg por planta, en raíz y parte aérea de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO₃.

Días	TTO	PARTE AÉREA				RAÍZ			
		N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
25	control	46	71	2	4	19	32	0.7	1.3
	A	64	92	2	9	23	35	1.5	1.7
	B	47	66	2	4	18	29	1.2	1.5
26	control	50	76	2	4	18	32	0.9	1.3
	A	68	95	2	9	24	36	1.6	1.6
	B	62	86	2	5	21	34	1.3	2.1
29	control	66	11	2	6	27	46	1.3	2.0
	A	70	111	2	6	23	42	1.4	2.0
	B	67	96	3	7	21	34	1.8	2.4
32	control	99	155	4	10	26	47	1.3	2.1
	A	94	193	4	12	30	48	1.8	2.3
	B	79	118	3	7	20	38	1.8	1.7
39	control	195	207	5	12	33	73	2.1	2.8
	A	172	216	6	16	43	73	3.1	5.2
	B	187	259	7	22	37	71	2.2	6.7
MDS (0.05)		43	48	2	3	14	17	4	5

Tabla 4.7. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular, en plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*, tratadas con dos concentraciones de nitrato aplicadas al inicio del cultivo o una semana antes de floración. Variables: H, producción de hidrógeno en aire; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; ER, eficiencia relativa; PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco por planta; PSN peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; RPA, relación raíz/parte aérea; SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular.

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
PSR	1.000																	
PSPA	0.958	1.000																
PSP	0.969	0.998	1.000															
RPA	-0.666	-0.803	-0.775	1.000														
PSN	0.764	0.813	0.824	-0.494	1.000													
PNN	-0.218	-0.258	-0.227	0.616	0.286	1.000												
H	-0.541	-0.519	-0.511	0.491	-0.256	0.480	1.000											
ARA	-0.557	-0.548	-0.547	0.448	-0.435	0.169	0.886	1.000										
ARAP	0.400	0.448	0.463	-0.160	0.765	0.496	0.340	0.219	1.000									
ER	0.024	-0.056	-0.060	-0.083	-0.391	-0.674	-0.324	0.122	-0.351	1.000								
SS	-0.673	-0.656	-0.659	0.568	-0.494	0.129	0.297	0.466	-0.253	0.200	1.000							
IA	-0.674	-0.666	-0.666	0.587	-0.548	0.118	0.504	0.630	-0.193	0.177	0.832	1.000						
G6PDH	-0.315	-0.276	-0.277	0.335	-0.040	0.223	0.044	0.150	0.062	0.012	0.699	0.618	1.000					
6PGDH	-0.221	-0.122	-0.120	0.237	0.257	0.500	0.103	0.019	0.276	-0.330	0.592	0.463	0.788	1.000				
PEPC	-0.486	-0.343	-0.380	0.073	-0.500	-0.287	0.004	0.188	-0.394	0.172	0.520	0.446	0.447	0.265	1.000			
MDH	-0.223	-0.100	-0.125	-0.052	-0.126	-0.121	-0.191	-0.057	-0.184	0.046	0.477	0.184	0.637	0.536	0.686	1.000		
ICDH	0.067	0.177	0.170	-0.116	0.282	0.256	0.019	-0.054	0.318	-0.342	0.027	-0.128	0.313	0.480	0.406	0.642	1.000	
PRT	0.483	0.487	0.475	-0.474	0.237	-0.308	-0.656	-0.653	-0.152	-0.070	-0.459	-0.689	-0.111	-0.225	0.131	0.354	0.425	1.000

P _≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.514	0.641	0.760

Tabla 4.8. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y el contenido en N, K, Ca y Mg de raíz y parte aérea. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco de planta completa; RPA, relación de peso seco de raíz/parte aérea; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; H, producción de hidrógeno; ARA, actividad reductora de acetileno; ER, eficiencia relativa; ARAP, actividad reductora de acetileno por planta; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r, contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz.

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r	
PSR	1.000																		
PSPA	0.958	1.000																	
PSP	0.969	0.998	1.000																
RPA	-0.666	-0.803	-0.775	1.000															
PSN	0.764	0.813	0.824	-0.494	1.000														
PNN	-0.218	-0.258	-0.227	0.616	0.286	1.000													
H	-0.541	-0.519	-0.511	0.491	-0.256	0.480	1.000												
ARA	-0.557	-0.548	-0.547	0.448	-0.435	0.169	0.886	1.000											
ARAP	0.400	0.448	0.463	-0.160	0.765	0.496	0.340	0.219	1.000										
ER	0.024	-0.056	-0.060	-0.083	-0.391	-0.674	-0.324	0.122	-0.351	1.000									
N	-0.124	-0.195	-0.176	0.221	-0.126	-0.021	-0.341	-0.299	-0.393	0.260	1.000								
K	-0.317	-0.170	-0.204	-0.208	-0.399	-0.433	-0.096	-0.082	-0.598	0.046	0.237	1.000							
Ca	-0.379	-0.382	-0.389	0.215	-0.531	-0.022	0.185	0.047	-0.518	-0.212	0.050	0.367	1.000						
Mg	-0.220	-0.216	-0.236	-0.061	-0.539	-0.659	-0.252	0.039	-0.614	0.547	0.227	0.289	-0.008	1.000					
N _r	-0.646	-0.668	-0.682	0.400	-0.853	-0.361	0.020	0.301	-0.721	0.504	0.242	0.379	0.210	0.698	1.000				
K _r	-0.276	-0.200	-0.216	-0.040	-0.161	-0.230	-0.054	0.107	-0.118	0.382	0.455	0.374	-0.152	0.030	0.263	1.000			
Ca _r	-0.244	-0.197	-0.216	-0.265	-0.457	-0.631	-0.290	-0.090	-0.567	0.475	0.344	0.380	0.346	0.555	0.466	0.287	1.000		
Mg _r	0.440	0.439	0.435	-0.359	0.115	-0.362	-0.415	-0.417	-0.229	-0.015	0.174	0.135	0.409	0.266	-0.094	-0.275	0.228	1.000	

Valor crítico
P ≤

0.05	0.010	0.001
0.514	0.641	0.760

Tabla 4.9. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular y el contenido en N, K, Ca y Mg en raíz y parte aérea, en plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*, tratadas con dos concentraciones de nitrato aplicadas al inicio del cultivo o una semana antes de floración. Variables: SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz.

	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r	
SS	1.000																
IA	0.832	1.000															
G6PDH	0.699	0.618	1.000														
6PGDH	0.592	0.463	0.788	1.000													
PEPC	0.520	0.446	0.447	0.265	1.000												
MDH	0.477	0.184	0.637	0.536	0.686	1.000											
ICDH	0.027	-0.128	0.313	0.480	0.406	0.642	1.000										
PRT	-0.459	-0.689	-0.111	-0.225	0.131	0.354	0.425	1.000									
N	0.280	0.179	0.172	0.190	-0.099	0.032	-0.198	-0.202	1.000								
K	0.240	0.178	-0.199	-0.036	0.409	0.168	-0.175	-0.123	0.237	1.000							
Ca	-0.162	-0.102	-0.403	-0.414	0.193	0.045	0.047	0.128	0.050	0.367	1.000						
Mg	0.406	0.485	0.452	0.004	0.500	0.406	-0.191	0.065	0.227	0.289	-0.008	1.000					
N _r	0.732	0.620	0.373	0.051	0.698	0.429	-0.081	-0.089	0.242	0.379	0.210	0.698	1.000				
K _r	0.281	0.165	-0.030	-0.010	0.230	-0.083	-0.219	-0.344	0.455	0.374	-0.152	0.030	0.263	1.000			
Ca _r	0.036	-0.050	-0.074	-0.285	0.256	0.299	-0.093	0.195	0.344	0.380	0.346	0.555	0.466	0.287	1.000		
Mg _r	-0.379	-0.365	-0.126	-0.291	0.055	0.219	0.166	0.557	0.174	0.135	0.409	0.266	-0.094	-0.275	0.228	1.000	

P ≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.514	0.641	0.760

4.2. Resultados obtenidos con judía.

4.2.1. Análisis de crecimiento.

La judía mostró una mayor sensibilidad al nitrato en el medio de cultivo que las habas, lo que se manifestó en diferencias significativas entre tratamientos en los parámetros de crecimiento estudiados.

Cuando el nitrato se adicionó desde el inicio del cultivo (tratamiento A) se obtuvieron los mayores incrementos de crecimiento respecto al control, especialmente a partir del tercer muestreo. En el peso seco total por planta (Fig. 4.14) estos aumentos fueron del 33, 42 y 70% en la tercera, cuarta y quinta recogida, respectivamente. El tratamiento B (adición de 8 mM de nitrato al final del crecimiento vegetativo) no produjo diferencias significativas de PSP respecto al control hasta el último muestreo, siendo en este del 26.3% superior respecto al control. De hecho, en las recogidas segunda, tercera y cuarta parece incluso disminuir algo el crecimiento, aunque las diferencias no son significativas.

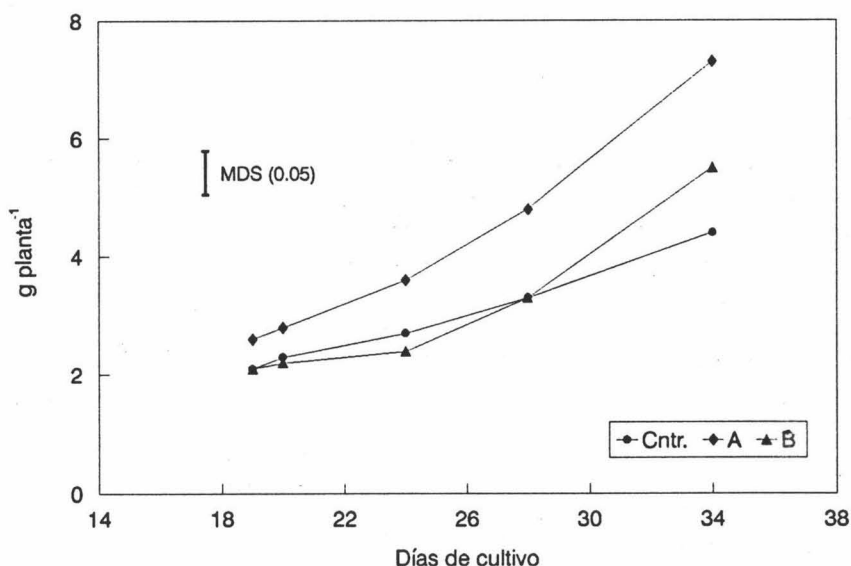


Fig. 4.14. Peso seco de planta, expresados en g planta⁻¹, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO₃ desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

Al estudiar el crecimiento de cada órgano vegetativo por separado, con el tratamiento A el mayor incremento se obtuvo en el peso seco de parte aérea, que llegó a ser del 93% en el quinto muestreo, mientras que el aumento de raíz solo fue del 45%. Así mismo, el tratamiento B causó un mayor aumento de parte aérea (40%) que de raíz (12%). En consecuencia, la relación de peso seco de raíz/parte aérea (Fig 4.15) disminuyó con el nitrato, de modo más acusado con 8 mM de nitrato aplicado al inicio del cultivo que cuando se aplicó al final del periodo vegetativo.

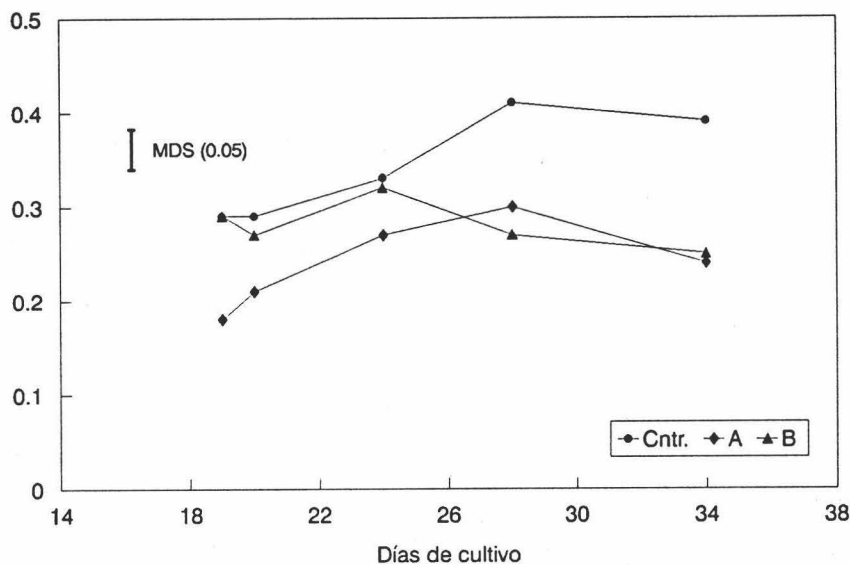


Fig. 4.15. Relación de peso seco de raíz/parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

Como en otros experimentos realizados, se encontró una alta correlación entre los diferentes componentes del peso seco de la planta (Tab. 4.16). También se detectaron coeficientes de correlación significativos, positivos o negativos, entre el peso seco de la planta, algunas de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado y el contenido de nutrientes.

En el último muestreo se recogieron vainas, pues la fructificación en esta especie fue más precoz que en *Vicia faba*. En ambos tratamientos el nitrato provocó

un aumento del 30% en el peso seco de fruto respecto al control.

En la tabla 4.10 se recogen, a modo de resumen, los datos de los parámetros de crecimiento estudiados, junto con las mínimas diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Como en los experimentos anteriores, estos datos son media de seis repeticiones procedentes de al menos dos ensayos con cada tratamiento.

Tabla 4.10. Parámetros de crecimiento en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* crecidas con 8 mM KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o con 2 mM KNO_3 desde el inicio aumentando a 8 mM una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO_3 . Peso seco de raíz (PSR) parte aérea (PSPA), fruto (PSF) y planta completa (PSP) expresados en g planta⁻¹; relación raíz/parte aérea (RPA).

Días	TTO.	PSR	PSPA	PSP	PSF	RPA
19	control	0.36 a	1.6 a	2.1 a		0.29cde
	A	0.38 a	2.2abcde	2.6ab		0.18a
	B	0.36 a	1.6 a	2.1 a		0.29cde
20	control	0.39 a	1.8abc	2.3 a		0.29cde
	A	0.46 ab	2.3bcde	2.8ab		0.21ab
	B	0.36 a	1.7ab	2.2 a		0.27bcde
24	control	0.51 ab	2.0abcd	2.7ab		0.33ef
	A	0.72 cd	2.8ef	3.6 c		0.27bcde
	B	0.48 ab	1.8abc	2.4 a		0.32def
28	control	0.70 c	2.4cdef	3.3bc		0.41g
	A	1.04 f	3.7g	4.8de		0.30cd
	B	0.59 bc	2.6def	3.3bc		0.27bcde
34	control	0.86 de	3.0 f	4.4 d	0.14 a	0.39fg
	A	1.25 g	5.8h	7.3 f	0.21 b	0.24abc
	B	0.96 ef	4.2g	5.5 e	0.20 b	0.25abcd
MSD (0.05)		0.15	0.6	0.7	0.05	0.07

*a-g: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

4.2.2. Fijación de nitrógeno.

La mayor sensibilidad de esta especie al nitrato también se manifestó en los parámetros de nodulación y de la actividad nitrogenasa. El peso seco de nódulos (Fig. 4.16) con el tratamiento A fue muy inferior al control, del orden de 10, 6, 4, 4.5 y 3 veces menor en el primer, segundo, tercer, cuarto y quinto muestreo respectivamente. En cambio, el tratamiento B no mostró diferencias significativas en las dos primeras recogidas, siendo 1.6, 2.7 y 2.8 veces menor respecto al control en la tercera, cuarta y quinta recogida respectivamente. Además, el crecimiento de la masa nodular se detuvo a partir de la segunda recogida, permaneciendo casi constante hasta el final del experimento.

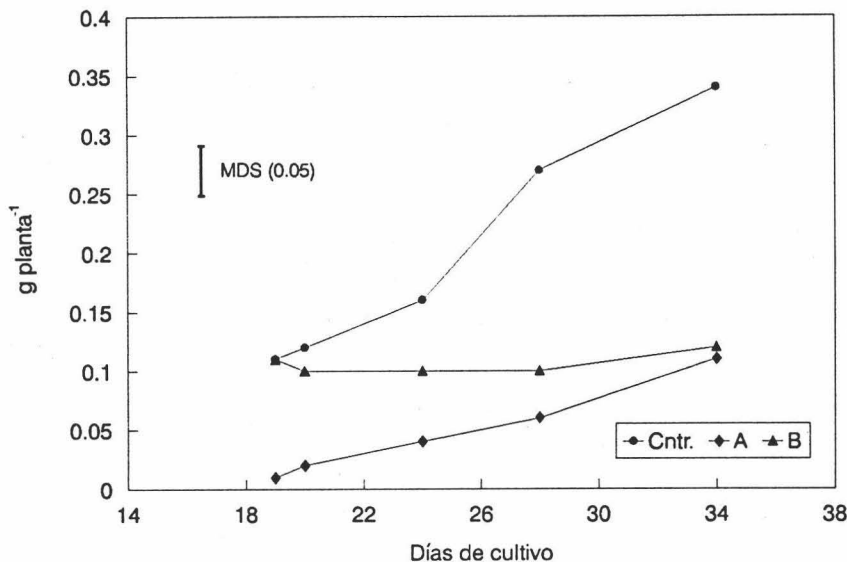


Fig. 4.16. Peso seco de nódulos, expresado en g planta^{-1} , de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

El peso normalizado de nódulos tiende a aumentar con el tiempo, tanto en plantas control como con el tratamiento A. En el control este parámetro permanece igual en los dos primeros muestreos, aumenta en el tercero y cuarto, quedando estable en el quinto. Con el tratamiento A la disminución del PNN es espectacular, siendo

13.8, 9.6, 5.7, 7.1 y 6.3 veces inferior al control en cada recogida, respectivamente. Este descenso es consecuencia de la disminución de PSN por una parte, y del aumento de PSPA por otra. La bajada drástica de PNN con el tratamiento B solo se produce a partir de la cuarta recogida.

A diferencia de los experimentos anteriores, el PSN no mostró correlación alguna con los parámetros de crecimiento, existiendo una alta correlación positiva entre el peso seco de nódulos, el peso normalizado de nódulos y la actividad reductora de acetileno por planta.

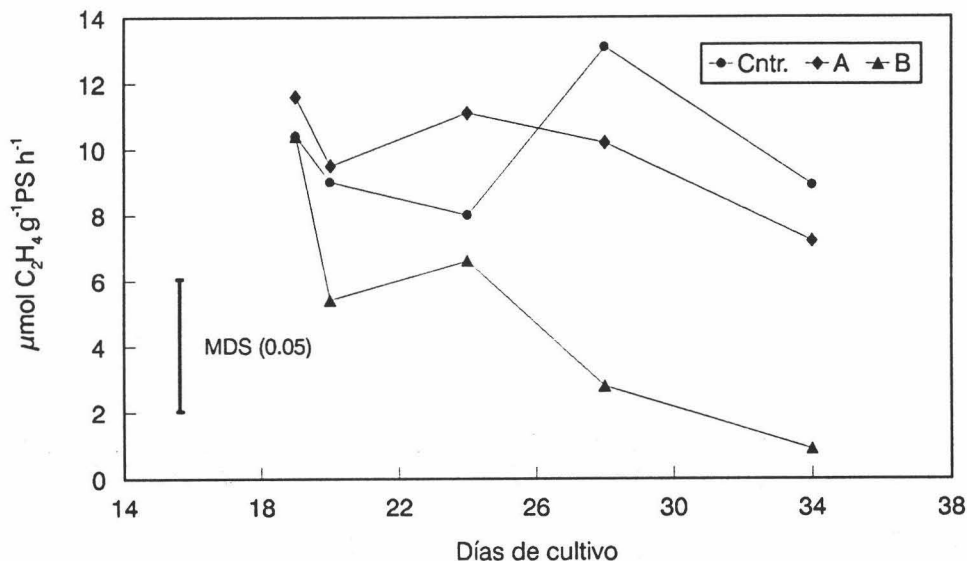


Fig. 4.17. Actividad reductora de acetileno, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ PS h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

El nitrato aplicado desde el inicio del cultivo no afectó a la actividad nitrogenasa, medida como actividad reductora de acetileno específica (Fig. 4.17). Sin embargo, la dosis elevada de nitrato al final del periodo vegetativo produjo un fuerte descenso de este parámetro, tal como sucedió con la producción de hidrógeno. Esta caída se manifiesta desde las venticuatro horas de aplicación del nitrato y fue más fuerte en la cuarta y quinta recogida.

La actividad ARA específica presenta un coeficiente de correlación positivo (Tab. 4.16) muy alto con la producción de hidrógeno por la nitrogenasa ($r=0.937$). En cambio, no se correlaciona significativamente con el crecimiento de la planta, actividades del metabolismo carbonado nodular o contenido de nutrientes.

La actividad reductora de acetileno total por planta (Fig. 4.18) también resultó afectada por ambos tratamientos respecto al control. Tanto el en control como en el tratamiento A, ARAP aumenta con el tiempo de cultivo, tal como se observó en el estudio de la ontogenia. Los valores obtenidos en el tratamiento A son inferiores al control, debido a la disminución de PSN ya comentada, pues este tratamiento no afectó a la ARA específica. En cambio, en el tratamiento B el descenso de ARAP viene determinado por los dos factores, tanto la caída de ARA como de PSN. Aunque en el segundo y tercer muestreo el nivel de ARAP permanece superior al tratamiento A, en el cuarto y quinto la disminución es espectacular, detectándose los menores valores. La actividad nitrogenasa total por planta presenta una correlación positiva altamente significativa con el PSN, PNN y RPA (Tab. 4.16), así como una correlación negativa con el contenido de K, Ca y Mg en parte aérea y de N en raíz.

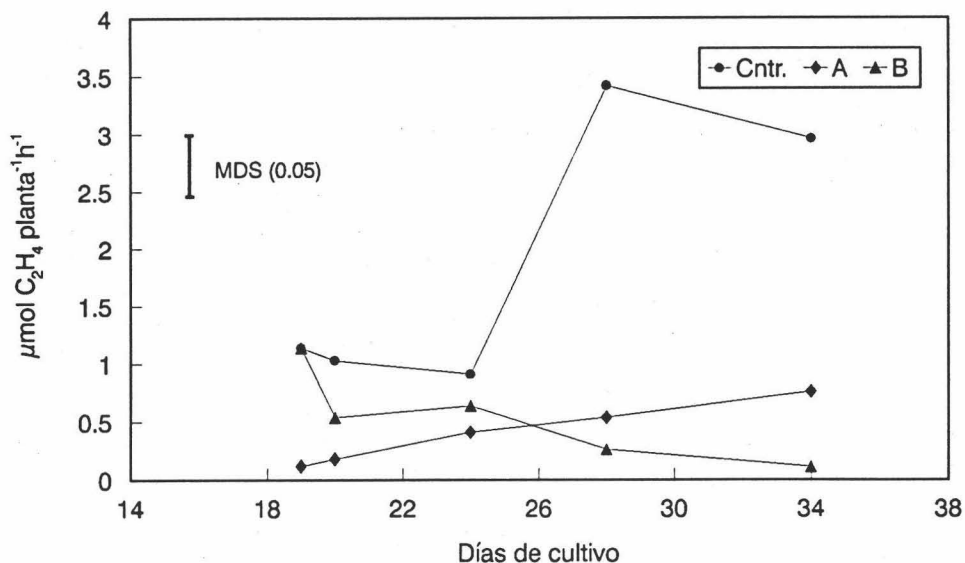


Fig. 4.18. Actividad reductora de acetileno total por planta, expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. Leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

La producción de hidrógeno por la nitrogenasa (Tab. 4.11) se afectó poco cuando el cultivo está adaptado a 8 mM de nitrato desde el inicio, obteniéndose valores similares a las plantas control, pero mucho más bajos que en los experimentos realizados con *V. faba* (Tab. 4.2). En cambio con en tratamiento B la disminución fue tal que a partir de la segunda recogida, 24 horas tras la aplicación de la dosis alta de nitrato, no pudo detectarse hidrógeno en ninguno de los muestreos. La producción de hidrógeno se correlaciona con ARA muy significativamente presentando correlación positiva ($P < 0.05$) con las enzimas de la degradación de la sacarosa (Tab. 4.16). Al no detectarse hidrógeno en los cuatro muestreos siguientes a la aplicación del nitrato, faltan cuatro datos en la tabla de medias (Tab. 4.11) por lo que en la matriz de coeficientes de correlación simple se indica que el número de datos empleados para el cálculo de los coeficientes es de 11 ($n=11$) para H y ER, siendo de 15 ($n=15$) para todas las demás variables.

Puesto que el nitrato no afectó a la producción de hidrógeno por la nitrogenasa ni a la actividad reductora de acetileno específica, la eficiencia relativa tampoco presentó diferencias significativas entre el control y el tratamiento A. Hay que señalar, sin embargo, que este parámetro no se pudo determinar en el tratamiento B debido a la imposibilidad de medir la producción de hidrógeno.

En la tabla 4.11 se recogen los datos relacionados con la nodulación y la fijación de nitrógeno junto con la MDS a $P \leq 0.05$. Estos datos, al igual que los de crecimiento, son media de seis repeticiones procedentes de al menos dos ensayos con cada tratamiento.

Tabla 4.11. Parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno, en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o con 2 mM KNO₃ desde el inicio aumentando a 8 mM una semana antes de la aparición de botones florales (B); el control creció con 2 mM KNO₃. Producción de hidrógeno (H); actividad reductora de acetileno específica (ARA) y total por planta (ARAP); eficiencia relativa (ER); peso seco de nódulos (PSN) en g planta⁻¹; peso normalizado de nódulos (PNN).

Días	TTO.	PSN	PNN	H	ARA	ARAP	ER
19	control	0.11 d	69 ef	3.33 bcd	10.4 cde	1.14 d	0.68 a
	A	0.01 a	5 a	3.48 cd	11.6 de	0.12 a	0.70 a
	B	0.11 d	69 ef	3.33 bcd	10.4 cde	1.14 d	0.68 a
20	control	0.12 de	68 ef	2.27 ab	9.0 cde	1.03 c	0.75 ab
	A	0.02 ab	8 ab	2.83 bcd	9.5 cde	0.18 ab	0.71 ab
	B	0.10 cd	59 e	ND	5.4 abc	0.54 abcd	ND
24	control	0.16 e	80 f	1.72 a	8.0 cd	0.91 cd	0.79 b
	A	0.04 ab	13 ab	2.96 bcd	11.1 de	0.41 abc	0.74 ab
	B	0.10 cd	58 e	ND	6.6 bc	0.64 abcd	ND
28	control	0.27 f	113 g	3.84 d	13.1 e	3.43 e	0.71 ab
	A	0.06 bc	15 abc	2.60 abc	10.2 cd	0.54 abcd	0.75 ab
	B	0.10 cd	38 d	ND	2.8 ab	0.26 ab	ND
34	control	0.34 g	111 g	2.27 ab	8.9 cde	2.96 e	0.75 ab
	A	0.11 d	19 bc	1.68 a	7.2 bcd	0.76 bcd	0.76 ab
	B	0.12 de	28 cd	ND	0.9 a	0.11 a	ND
MDS (0.05)		4	13	1.1	5	0.63	8

*a-g: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

4.2.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado.

En judía, la actividad sacarosa sintasa mostró un comportamiento distinto al observado en haba, disminuyendo con la aplicación de nitrato a la solución nutritiva (Figs. 4.18 y 4.12 respectivamente). El tratamiento A produjo un descenso del 25% en las dos primeras recogidas. En la tercera la SS disminuye en las plantas control por debajo de los tratamientos con nitrato, recuperándose en las dos últimas en las cuales el descenso de esta actividad enzimática fue más importante con el tratamiento B que con el A. Esta actividad se correlaciona negativamente con el peso seco de la planta (Tab. 4.16), con la eficiencia relativa y con el contenido de K y Ca en parte aérea (Tab. 4.18), y positivamente con la invertasa alcalina ($r=0.935$), PEPC, MDH e ICDH (Tab. 4.16).

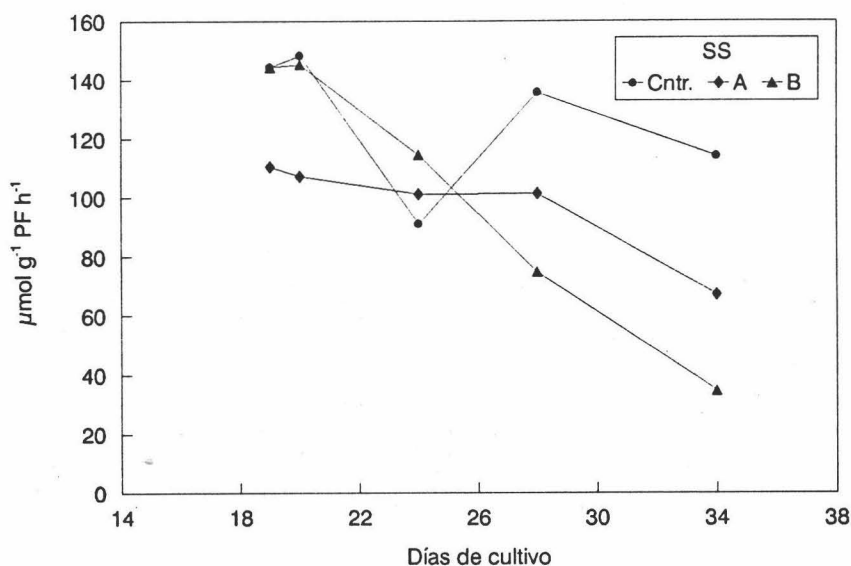


Fig. 4.18. Actividad sacarosa sintasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

Los valores de la actividad invertasa alcalina (Fig. 4.19) representan entre el 11 y el 30% de los de la sacarosa sintasa. El nitrato aplicado desde el inicio del cultivo condicionó la caída de la IA en todos los muestreos, mientras que aplicado al final del

periodo vegetativo solo descendió en los dos últimos. Esta actividad enzimática tiene una correlación muy alta con la sacarosa sintasa y al igual que ella, presenta correlación negativa significativa con la acumulación de peso seco (Tab. 4.16), eficiencia relativa y contenido de K y Ca en parte aérea (Tab. 4.18), y positiva con la actividad nitrogenasa, PEPC, MDH e ICDH.

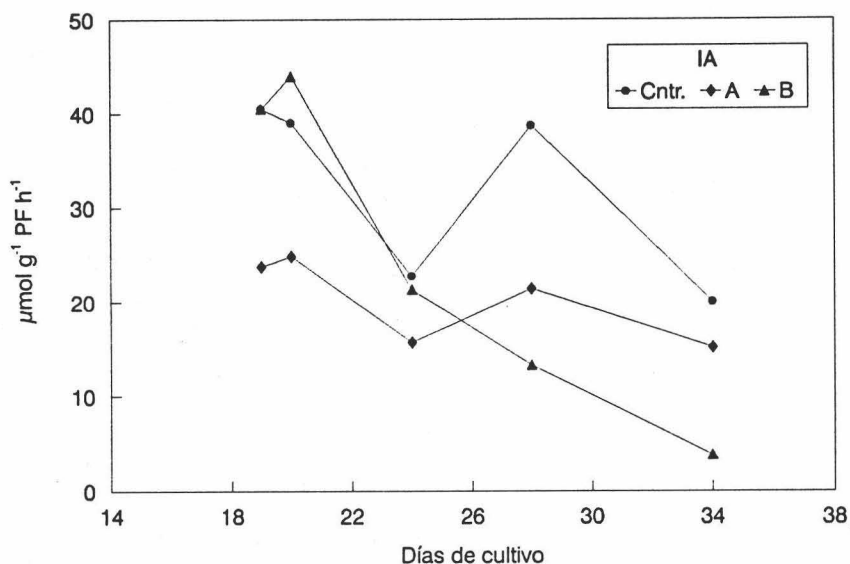


Fig 4.19. Actividad invertasa alcalina, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

En judía la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa fue superior a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig. 4.20), al contrario de lo encontrado en todos los experimentos con habas. La correlación entre ambas actividades fue positiva y muy alta ($r=0.977$, Tab. 4.16). Estas enzimas se afectaron muy poco por el nitrato aplicado desde el inicio del cultivo (Tratamiento A), mientras que aplicado antes de floración hizo descender fuertemente las dos actividades en la cuarta y quinta recogida, llegando a ser un 57% respecto al control en la última recogida.

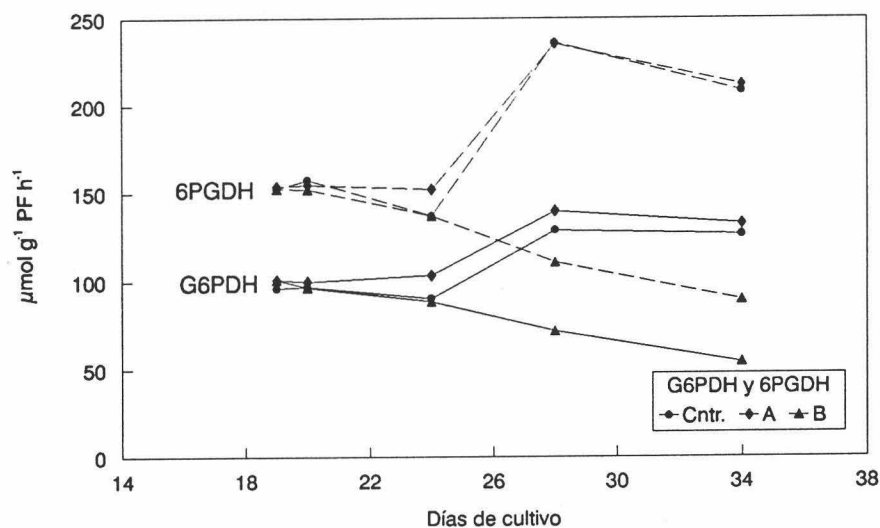


Fig. 4.20. Actividades glucosa-6-P y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

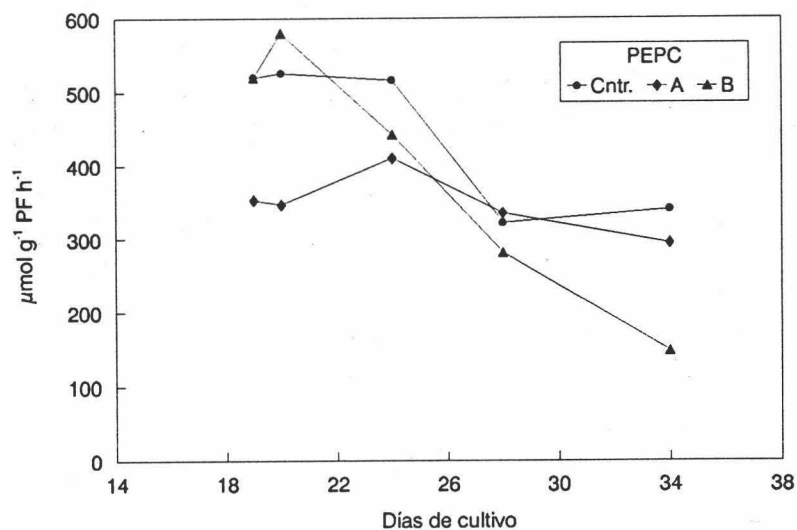


Fig. 4.21. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

El nitrato desde el inicio también hizo descender la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa en todos los muestreos salvo en el cuarto. Aplicado al final del periodo vegetativo, el descenso de se produjo en los dos últimos muestreos y fue más importante que el del tratamiento A, en torno al 57% en la última recogida.

La actividad malato deshidrogenasa en judía también mostró valores muy superiores a la actividad PEPC, entre 5 y 12 veces superiores. El comportamiento de la MDH con el nitrato fue parecido al descrito para la PEPC: en el tratamiento A se observó una disminución en los tres primeros muestreos respecto a las plantas control, variando la tendencia en el cuarto y quinto; en el tratamiento B, la MDH fue disminuyendo desde la segunda recogida.

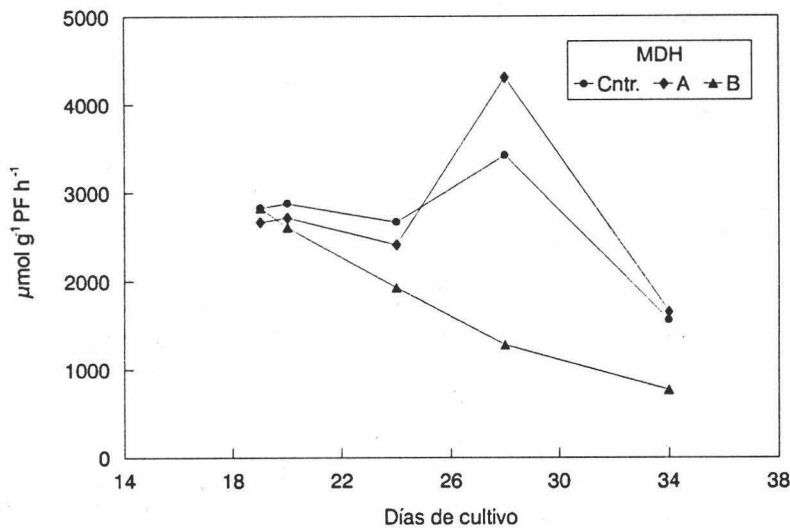


Fig 4.22. Actividad malato deshidrogenasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

La actividad isocitrato deshidrogenasa disminuyó de forma continua desde el primer muestreo. Al contrario de las otras enzimas estudiadas la ICDH se afectó poco por el nitrato, presentando diferencias escasas entre tratamientos. En la tercera recogida los tratamientos con nitrato dieron valores algo superiores al control. En la cuarta, solo el tratamiento B fue superior al control y en la última, en cambio, fue el control el que presentó valores más altos.

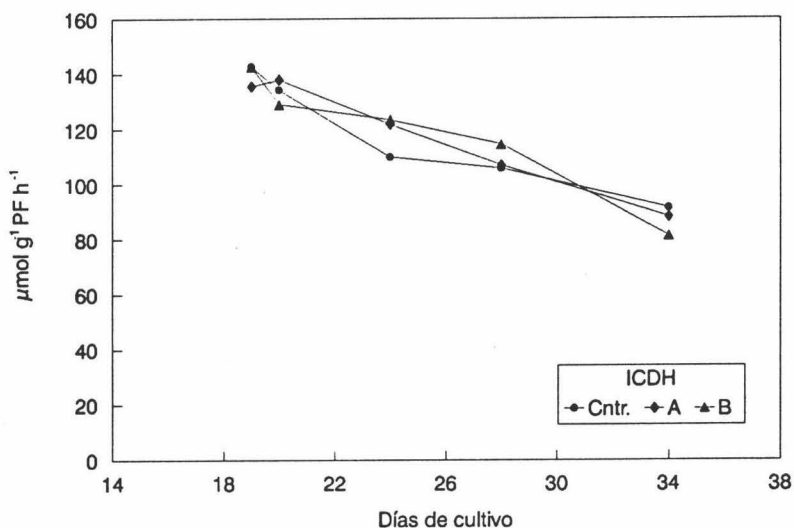


Fig. 4.22. Actividad isocitrato deshidrogenasa, expresada en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$, de plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con la cepa RCR3644 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, tratadas con 8 mM KNO_3 desde el inicio (A) o una semana antes de la aparición de los botones florales (B); control con 2 mM.

En la tabla 4.12 se aprecia que el contenido de proteína soluble de los nódulos presenta pocas diferencias entre tratamientos. Con el tratamiento A los valores fueron muy similares al control a excepción del tercer muestreo con un valor superior en un 30%. Con el tratamiento B se produjo una disminución de proteínas a las 24 horas de aplicación del nitrato que se recuperó en el cuarto muestreo, para descender de nuevo en el último.

En las tablas 4.12 y 4.13 se exponen, a modo de resumen, los resultados de las actividades enzimáticas del metabolismo carbonado expresadas en $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$ y en $\text{nmol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$, respectivamente, junto con las mínimas diferencias significativas a $P < 0.05$. Estos datos son media de cuatro repeticiones, representativas de al menos dos ensayos por cada tratamiento.

Tabla 4.12. Contenido de proteína, expresado en mg g⁻¹ PF y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos, expresadas en μmol g⁻¹ PF h⁻¹, en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o con 2 mM KNO₃ desde el inicio aumentando a 8 mM una semana antes de la aparición de botones florales (B); el control creció con 2 mM KNO₃.

Días	TTO.	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
19	control	144i	41g	96d	152d	520g	2831i	143i	11.5d
	A	110fg	24f	101ef	154d	353d	2668gh	136h	11.0cd
	B	144i	41g	96d	152d	520g	2831i	143i	11.5d
20	control	148i	39g	97de	158d	526g	2882i	134gh	11.5d
	A	107f	25f	100def	155d	347d	2718h	138hi	10.9cd
	B	145i	44h	97de	152d	580h	2611g	129fg	8.2a
24	control	91d	23ef	91c	137c	517g	2672gh	110cd	8.4a
	A	101e	16c	103f	152d	410e	2415f	122c	11.1d
	B	114g	21de	89c	137c	442f	1925e	124ef	9.9bc
28	control	136h	39g	129gh	236f	322c	3422j	106c	8.8ab
	A	101e	21de	140i	235f	335cd	4308k	107c	8.7a
	B	75c	13b	72b	111b	281b	1281b	115d	11.3d
34	control	114g	20d	127g	208e	341cd	1560c	91b	10.4cd
	A	67b	15bc	133h	212e	295b	1653d	88b	10.4cd
	B	35a	4a	54a	90a	148a	763a	81a	8.8ab
MDS (0.05)		4	2	4	8	19	86	6	1.2

*a-k: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de P ≤ 0.05 según un test de mínimas diferencias significativas.

Tabla 4.13. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado, expresadas en nmol mg^{-1} proteína min^{-1} y contenido de proteína expresado en $\text{mg } \frac{1}{g}$ PF, en el citosol nodular de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* crecidas con 8 mM KNO_3 desde el inicio del cultivo (A) o con 2 mM KNO_3 desde el inicio aumentando a 8 mM una semana antes de la aparición de botones florales (B); el control creció con 2 mM KNO_3 .

Días	TTO.	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH
19	control	209g	59g	139b	221b	754f	4103g	207fg
	A	167d	36d	153c	233bc	535d	4042g	205efg
	B	209g	59g	139b	221b	754f	4103g	207fg
20	control	215g	57g	141b	228bc	762f	4177g	195e
	A	164d	38d	154c	238c	532d	4170g	212gh
	B	294i	89y	196e	308e	1174h	5281h	261i
24	control	180e	45f	179d	271d	1022g	5288h	218h
	A	152c	24c	156c	229bc	617c	3634f	184d
	B	192f	36d	149c	230bc	743f	3233e	208fgh
28	control	258h	73h	245g	448g	611e	6496i	201ef
	A	193f	41e	267h	449g	640e	8221j	204efg
	B	110b	20b	106a	164a	416b	1894b	169c
34	control	182e	32d	203e	333f	545d	2497c	146ab
	A	107b	24c	212f	339f	471c	2640d	141a
	B	66a	7a	103a	171a	281a	1449a	154b
MDS (0.05)		7	3	7	13	30	141	10

*a-k: medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna, no difieren a nivel de $P \leq 0.05$ según un test de mínimas diferencias significativas.

4.2.4. Determinaciones analíticas.

El contenido de nitrógeno en parte aérea, expresado en tanto por ciento de peso seco, tiende a disminuir en las tres primeras recogidas en las plantas control, manteniendo el nivel en las dos últimas. En el tratamiento A se mantiene en las tres primeras recogidas, siendo el contenido en la 3 un 16% superior al control, y desciende en las dos últimas con valores parecidos al control. En el tratamiento B se mantiene a lo largo de todo el tiempo de cultivo, produciendo un contenido de N mayor al control en un 16 y un 13% en el 4 y 5 muestreo respectivamente.

El contenido de N en raíz es entre un 14 y un 53% menor que en parte aérea, correspondiendo las mayores diferencias en general a las plantas control en las que los valores se mantienen en las dos primeras recogidas y bajan en las siguientes, salvo un incremento en la 4. En el tratamiento A se observan los valores más altos en las tres primeras recogidas, mientras que los mayores de la 4 y 5 se observan en el tratamiento B.

El N en parte aérea se correlaciona positivamente con la producción de hidrógeno y negativamente con los parámetros de crecimiento, actividades en zimáticas G6PDH, 6PGDH, ICDH, contenido de proteína y contenido de Ca y Mg en raíz.

El N en raíz mostró correlaciones positivas con K y Ca en raíz, y negativas con RPA, nodulación (PSN y PNN) y ARAP.

El nitrato potencia la acumulación de K en parte aérea puesto que con el tratamiento A todos los valores del contenido de este elemento fueron superiores al control y con el tratamiento B lo fueron a partir de la tercera recogida. En raíz El tratamiento A también dio los valores más altos de contenido en K, mientras que el tratamiento B tuvo el efecto contrario dando valores inferiores al control a partir de las 24 horas de aplicación,, lo que parece indicar que el nitrato favorece la movilización del potasio hacia la parte aérea.

El contenido de K en parte aérea mostró correlaciones positivas con PSPA, contenido de Ca en parte aérea y de N y K en raíz. Coeficientes de correlación negativos se obtuvieron con RPA, nodulación y actividades SS, IA y PEPC.

El K en raíz se correlacionó positivamente con ARA, actividades G6PDH y 6PGDH y con el contenido de Mg en raíz.

La concentración de calcio en parte aérea fue superior a la de raíz en algunos casos hasta en un 50%. Los tratamientos con nitrato no parecen tener efecto alguno sobre el contenido de este elemento.

El calcio en parte aérea presentó correlaciones positivas con el K en parte aérea y el N en raíz; presentó correlaciones negativas con RPA, PNN, ARAP, las actividades SS, IA y PEPC. En raíz, se encontraron correlaciones positivas con PSR, PSPA y PSP, y el contenido de Mg en raíz; las correlaciones negativas encontradas fueron con N en parte aérea y la actividad ICDH.

El magnesio se acumula en parte aérea en cantidades superiores a la raíz en los primeros muestreos, encontrándose diferencias de más del 50%, mientras que el control y el tratamiento A en raíz llegan a tener valores iguales a PA en las dos últimas recogidas. El tratamiento A favorece mayores concentraciones de Mg en parte aérea, aun cuando las diferencias son poco significativas. En raíz solo se obtuvieron valores superiores con el tratamiento A en los dos últimos muestreos. El tratamiento B aumentó el contenido de Mg en parte aérea solo en las recogidas 4ª y 5ª, en cambio en raíz lo hace disminuir en todas. El contenido de Mg en parte aérea presenta correlación negativa con RPA, PSN, PNN y ARAP; en raíz se correlaciona con PSR, PSPA, PSP, enzimas de la vía de la pentosas-fosfato y contenido en K y Ca en raíz, mientras que el coeficiente de correlación fue negativo con el contenido de N en parte aérea.

En las tablas 4.14 y 4.15 se exponen los datos de contenido de los elementos analizados, expresados como porcentaje de peso seco y en mg por planta, respectivamente, junto con las mínimas diferencias significativas para $P \leq 0.05$.

Tabla 4.14. Contenido en N, K, Ca y Mg, expresado como porcentaje de peso seco, en raíz y parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO₃.

Días	TTO.	Parte aérea				Raíz			
		N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
19	control	3.12	3.40	0.27	0.48	2.10	2.81	0.16	0.29
	A	3.20	5.31	0.35	0.58	2.62	5.24	0.15	0.26
	B	3.12	3.40	0.27	0.48	2.10	2.81	0.16	0.29
20	control	3.11	3.35	0.26	0.43	2.13	2.90	0.16	0.30
	A	3.30	5.35	0.35	0.63	2.55	5.10	0.14	0.28
	B	3.06	3.67	0.30	0.40	1.86	1.96	0.16	0.21
24	control	2.77	3.61	0.30	0.54	1.29	3.10	0.15	0.26
	A	3.21	5.15	0.30	0.57	1.97	5.21	0.16	0.20
	B	3.21	4.09	0.33	0.39	1.95	2.13	0.14	0.17
28	control	2.86	3.70	0.26	0.32	1.74	5.15	0.16	0.30
	A	2.82	4.99	0.33	0.41	2.29	5.41	0.20	0.40
	B	3.24	4.49	0.34	0.42	2.46	2.45	0.20	0.19
34	control	2.88	3.86	0.30	0.34	1.30	4.60	0.18	0.35
	A	2.72	4.80	0.33	0.43	2.35	5.26	0.23	0.47
	B	3.06	5.34	0.32	0.42	2.40	2.65	0.17	0.20
MDS (0.05)		0.41	0.52	0.06	0.1	0.32	0.48	0.08	0.11

Tabla 4.15. Contenido en N, K, Ca y Mg, expresado en mg g⁻¹ de peso seco, en raíz y parte aérea de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* crecidas con 8 mM KNO₃ desde el inicio del cultivo (A) o una semana antes de la aparición de botones florales (B); control con 2 mM KNO₃.

Días	TTO.	Parte aérea				Raíz			
		N	K	Ca	Mg	N	K	Ca	Mg
19	control	50	54	4	8	8	10	0.6	1.0
	A	70	117	8	13	10	20	0.6	1.0
	B	50	54	4	8	8	10	0.6	1.0
20	control	56	60	5	8	8	11	0.6	1.2
	A	76	123	8	14	12	23	0.6	1.3
	B	52	62	5	7	7	7	0.6	0.7
24	control	55	72	6	11	7	16	0.8	1.3
	A	90	144	8	16	14	38	1.2	1.4
	B	58	74	6	7	9	10	0.7	0.8
28	control	67	87	6	8	12	36	1.1	2.1
	A	105	185	12	15	24	56	2.1	4.1
	B	84	117	9	11	15	15	1.2	1.1
34	control	88	117	9	10	11	39	1.5	3.0
	A	157	277	19	25	29	66	2.9	5.9
	B	129	225	14	18	23	25	1.6	1.9
MDS (0.05)		39	35	3	6	11	16	0.6	0.8

Tabla 4.16. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular, en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tratadas con dos concentraciones de nitrato aplicadas al inicio del cultivo o una semana antes de floración. Variables: H, producción de hidrógeno en aire; ARA, actividad reductora de acetileno; ARAP, ARA por planta; ER, eficiencia relativa; PSN peso seco de nódulos; PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco por planta; PNN, peso normalizado de nódulos; RPA, relación raíz/parte aérea; SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular. (N=15; * N=11).

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H*	ARA	ARAP	ER*	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT
PSR	1.000																	
PSPA	0.946	1.000																
PSP	0.969	0.993	1.000															
RPA	0.114	-0.166	-0.060	1.000														
PSN	0.223	0.035	0.142	0.864	1.000													
PNN	-0.203	-0.388	-0.292	0.877	0.877	1.000												
H*	-0.464	-0.514	-0.522	0.005	-0.110	0.056	1.000											
ARA	-0.197	-0.294	-0.288	0.213	0.046	0.165	0.937	1.000										
ARAP	0.110	-0.094	0.001	0.861	0.899	0.852	0.185	0.436	1.000									
ER*	0.529	0.465	0.493	0.222	0.216	0.029	-0.858	-0.626	-0.016	1.000								
SS	-0.666	-0.744	-0.727	0.298	0.126	0.477	0.610	0.620	0.397	-0.628	1.000							
IA	-0.639	-0.670	-0.662	0.242	0.117	0.486	0.536	0.502	0.361	-0.607	0.935	1.000						
G6PDH	0.409	0.282	0.309	0.338	0.275	0.140	-0.114	0.673	0.513	0.253	0.304	0.231	1.000					
6PGDH	0.434	0.282	0.320	0.443	0.382	0.243	0.005	0.639	0.617	0.169	0.302	0.259	0.977	1.000				
PEPC	-0.697	-0.715	-0.717	0.130	-0.070	0.340	-0.018	0.333	0.040	-0.119	0.791	0.778	0.044	-0.031	1.000			
MDH	-0.222	-0.345	-0.354	0.163	-0.157	0.058	0.413	0.746	0.175	-0.187	0.614	0.606	0.573	0.576	0.444	1.000		
ICDH	-0.868	-0.793	-0.844	-0.307	-0.492	-0.086	0.532	0.423	-0.245	-0.684	0.720	0.663	-0.142	-0.212	0.698	0.453	1.000	
PRT	-0.302	-0.183	-0.221	-0.327	-0.252	-0.183	0.228	0.238	-0.127	-0.549	0.222	0.079	-0.094	-0.173	0.106	-0.136	0.507	1.000

Valor crítico			
P _≤	0.05	0.01	0.001
N=15	0.514	0.641	0.760
N=11	0.602	0.735	0.847

Tabla 4.17. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y el contenido en N, K, Ca y Mg de raíz y parte aérea, en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tratadas con dos concentraciones de nitrato aplicadas al inicio del cultivo o una semana antes de floración. Variables: PSR, peso seco de raíz; PSPA, peso seco de parte aérea; PSP, peso seco de planta completa; RPA, relación de peso seco de raíz/parte aérea; H, producción de hidrógeno; ARA, actividad reductora de acetileno; ER, eficiencia relativa; ARAP, actividad reductora de acetileno por planta; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r, contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz. (N=15; * N=11).

	PSR	PSPA	PSP	RPA	PSN	PNN	H*	ARA	ARAP	ER*	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r
PSR	1.000																	
PSPA	0.946	1.000																
PSP	0.969	0.993	1.000															
RPA	0.114	-0.166	-0.060	1.000														
PSN	0.223	0.035	0.142	0.864	1.000													
PNN	-0.203	-0.388	-0.292	0.877	0.877	1.000												
H*	-0.464	-0.514	-0.522	0.005	-0.110	0.056	1.000											
ARA	-0.197	-0.294	-0.288	0.213	0.046	0.165	0.937	1.000										
ARAP	0.110	-0.094	0.001	0.861	0.899	0.852	0.185	0.436	1.000									
ER*	0.529	0.465	0.493	0.222	0.216	0.029	-0.858	-0.626	-0.016	1.000								
N	-0.626	-0.516	-0.567	-0.484	-0.539	-0.353	0.529	-0.098	-0.470	-0.628	1.000							
K	0.456	0.559	0.503	-0.622	-0.536	-0.840	0.007	-0.165	-0.548	0.062	0.209	1.000						
Ca	0.268	0.391	0.335	-0.599	-0.500	-0.726	-0.225	-0.353	-0.612	0.166	0.210	0.797	1.000					
Mg	-0.347	-0.180	-0.257	-0.692	-0.706	-0.608	0.033	0.231	-0.603	-0.144	0.447	0.426	0.345	1.000				
N _r	0.041	0.253	0.158	-0.810	-0.745	-0.797	0.285	-0.168	-0.656	-0.458	0.489	0.627	0.523	0.364	1.000			
K _r	0.492	0.456	0.448	-0.065	-0.028	-0.301	0.086	0.613	0.205	0.134	-0.291	0.529	0.244	0.235	0.142	1.000		
Ca _r	0.772	0.790	0.790	-0.013	0.127	-0.185	-0.481	-0.267	0.016	0.379	-0.527	0.189	0.194	-0.386	0.188	0.253	1.000	
Mg _r	0.570	0.561	0.569	0.103	0.222	0.018	-0.462	0.368	0.321	0.284	-0.694	-0.010	-0.060	-0.168	0.000	0.587	0.626	1.000

P _≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
N=15	0.514	0.641	0.760
N=11	0.602	0.735	0.847

Tabla 4.18. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables relacionadas con las enzimas del metabolismo carbonado del citosol nodular y el contenido en N, K, Ca y Mg en raíz y parte aérea, en plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Contender inoculadas con la cepa RCR3644 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tratadas con dos concentraciones de nitrato aplicadas al inicio del cultivo o una semana antes de floración. Variables: SS, sacarosa sintasa; IA, invertasa alcalina; G6PDH, glucosa-6-P deshidrogenasa; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; PRT, proteína soluble en el citosol nodular; N, K, Ca y Mg contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en parte aérea; N_r, K_r, Ca_r y Mg_r contenido en nitrógeno, potasio, calcio y magnesio en raíz. (N=15).

	SS	IA	G6PDH	6PGDH	PEPC	MDH	ICDH	PRT	N	K	Ca	Mg	N _r	K _r	Ca _r	Mg _r
SS	1.000															
IA	0.935	1.000														
G6PDH	0.304	0.231	1.000													
6PGDH	0.302	0.259	0.977	1.000												
PEPC	0.791	0.778	0.044	-0.031	1.000											
MDH	0.614	0.606	0.573	0.576	0.444	1.000										
ICDH	0.720	0.663	-0.142	-0.212	0.698	0.453	1.000									
PRT	0.222	0.079	-0.094	-0.173	0.106	-0.136	0.507	1.000								
N	0.169	0.045	-0.581	-0.621	0.098	-0.176	0.648	0.562	1.000							
K	-0.686	-0.735	-0.054	-0.102	-0.715	-0.210	-0.283	-0.010	0.209	1.000						
Ca	-0.619	-0.674	-0.113	-0.192	-0.518	-0.301	-0.188	-0.048	0.210	0.797	1.000					
Mg	-0.076	-0.102	-0.225	-0.363	0.147	0.117	0.503	0.367	0.447	0.426	0.345	1.000				
N _r	-0.284	-0.229	-0.224	-0.237	-0.402	-0.061	0.218	0.382	0.489	0.627	0.523	0.364	1.000			
K _r	-0.131	-0.223	0.720	0.683	-0.407	0.349	-0.218	0.055	-0.291	0.529	0.244	0.235	0.142	1.000		
Ca _r	-0.452	-0.375	0.369	0.371	-0.442	-0.196	-0.592	-0.012	-0.527	0.189	0.194	-0.386	0.188	0.253	1.000	
Mg _r	0.010	0.063	0.792	0.778	-0.125	0.318	-0.299	0.020	-0.694	-0.010	-0.060	-0.168	0.000	0.587	0.626	1.000

P ≤	Valor crítico		
	0.05	0.01	0.001
	0.514	0.641	0.760



VI. Conclusiones

5. Purificación parcial y caracterización de la fosfoenolpiruvato carboxilasa nodular de *Vicia faba*.

5.1. Purificación parcial de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa citosólica de nódulos de *Vicia faba* fue parcialmente purificada a través de diferentes pasos en los que se incluyen la precipitación fraccionada con sulfato amónico, procesos cromatográficos de intercambio aniónico, ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular. Como los bacteroides aparentemente carecen de PEPC no se tomó ninguna precaución especial para evitar su rotura durante el homogeneizado de los nódulos.

Con objeto de asegurar un proceso de purificación efectivo se usaron un mínimo de 10 g de nódulos en cada tanda de purificación. El almacenamiento de los nódulos durante varios meses a -80°C no produjo pérdida apreciable de actividad. La enzima se extrajo en presencia de EDTA, DTT y 20% de etilenglicol, los cuales tuvieron un efecto estabilizador sobre la PEPC. Se utilizó para todos los procesos de purificación el tampón usado para la extracción (Apartado 7.1.1). Es interesante indicar que la enzima en el tampón de extracción mantenía su actividad durante varios días en frigorífico a 4°C . La actividad PEPC en nódulos de *Vicia faba* de 32 días de edad fue aproximadamente $7.5 \text{ U g}^{-1} \text{ PF}$.

A través de las cinco etapas de purificación que se reflejan en la tabla 5.1. se ha conseguido purificar la PEPC de la fracción citosólica de los nódulos 56.3 veces, obteniéndose una actividad específica de 24.8 U por mg de proteína y un rendimiento cercano al 43%.

Tabla 5.1. Purificación parcial de la PEPC de la fracción vegetal de nódulos de *Vicia faba* inoculada con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*.

Etapas de purificación	Actividad total	Proteínas totales	Actividad específica	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	75.0	172.5	0.4	1.0	100.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	72.7	44.5	1.6	3.7	96.9
DEAE-sefarosa	61.2	8.9	6.9	15.6	81.6
Q-sefarosa	45.3	6.0	7.6	17.3	60.4
Ultrafiltración	41.4	2.3	18.2	41.4	55.2
Sephacryl S-300	32.2	1.3	24.8	56.3	42.9

A continuación describiremos el proceso de purificación: Una vez obtenido el extracto crudo se procedió a concentrar la proteína mediante una precipitación fraccionada por saturación con sulfato amónico. Por este procedimiento se eliminó gran cantidad de proteína con escasa pérdida de actividad. Con esta técnica se consiguió además concentrar la proteína, reduciéndose el volumen de la muestra unas cuatro veces. La actividad PEPC se recuperó entre el 50 y el 70% de saturación consiguiéndose una actividad específica 3.7 veces superior a la del extracto inicial. El efecto inhibitor de elevadas concentraciones de iones amonio fue completamente eliminado por diálisis.

El extracto concentrado, resultante de la precipitación fraccionada, se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-sefarosa. El perfil de elución de las proteínas (Fig. 5.1) muestra un máximo de proteína a una concentración de KCl de 220 mM que coincide con el único máximo de actividad PEPC. Tras reunirse las fracciones con mayor actividad, se obtuvo una actividad específica de 6.88 U/mg proteína, lo que supone multiplicar el factor de purificación por 4.2 con un rendimiento de actividad del 81.6% respecto a la actividad inicial.

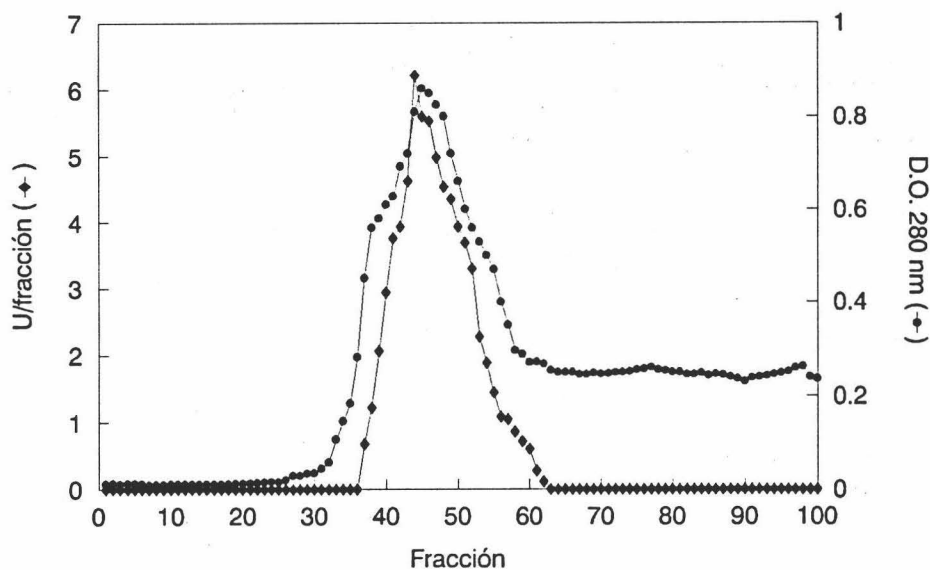


Fig. 5.1. Perfil de elución tras cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-sefarosa de la actividad PEPC nodular de *V. faba*.

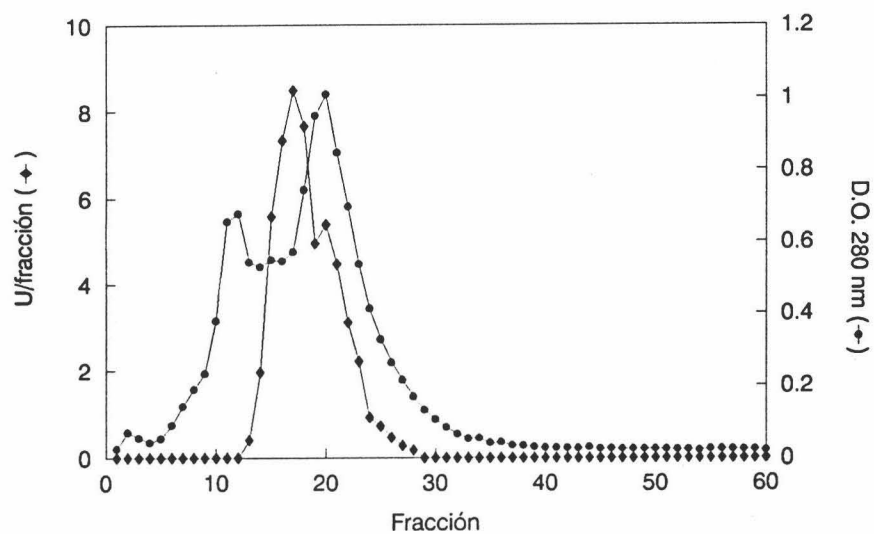


Fig. 5.2. Perfil de elución tras cromatografía de intercambio aniónico en Q-sefarosa de la actividad PEPC nodular de *V. faba*.

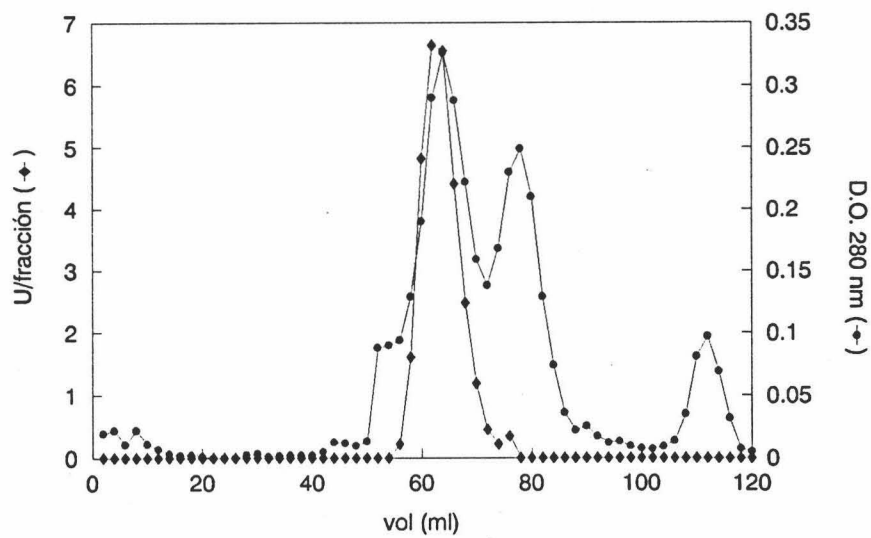


Fig. 5.3. Perfil de elución de la actividad PEPC tras cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-300.

La muestra eluida resultante de la cromatografía con DEAE-sefarosa se dializó para eliminar el KCl, tras lo cual se realizó un segundo proceso de cromatografía de intercambio iónico usando esta vez una columna de Q-sefarosa. En este caso el perfil de elución (Fig. 5.2) también mostró un único pico de actividad coincidiendo con el máximo de proteína, que eluyó a una concentración de KCl de 270 mM, obteniéndose un rendimiento de actividad del 60.4% respecto a la inicial, con una actividad específica de 7.6 U por mg de proteína.

Posteriormente se llevó a cabo un proceso de ultrafiltración con objeto de eliminar la mayor parte de las proteínas menores de 100 kDa, así como solutos de pequeño tamaño, además de conseguir concentrar la muestra a un volumen adecuado para cargarlo en la columna de Sephacryl S-300. Por este procedimiento se multiplicó el factor de purificación por 2.3.

La última etapa del proceso de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular. Esta técnica tiene dos aplicaciones: por una parte sirvió para aumentar la actividad específica en más de un 30%; por otra, esta técnica es un buen medio para estimar el peso molecular nativo del enzima. El perfil de elución de las proteínas a través de la columna de Sephacryl (Fig. 5.3) mostró tres picos de proteína principales. La actividad PEPC eluyó a un volumen de 62 ml, junto con el primer pico de proteína. Este volumen de elución es el que se utiliza para el cálculo del peso molecular nativo por comparación con los volúmenes de elución de proteínas patrón conocidas (Material y métodos, apartado 7.1.6).

5.2. Propiedades de la PEPC de nódulos radicales de habas.

5.2.1. Determinación del peso molecular.

La elución de la PEPC nativa a través de una columna calibrada de Sephacryl S-300 produjo un pico único de actividad. La recta de calibrado de la columna de Sephacryl (Fig. 5.4) representa los valores de K_{av} de las proteínas patrón utilizadas, así como el de la PEPC que coincidió exactamente con el de la apoferritina, por lo que se estimó su peso molecular nativo en 443 kDa.

La electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con SDS de la preparación de PEPC obtenida nos muestra que la enzima migra como una banda simple de proteína (Fig. 5.5). En los diferentes carriles se puede observar la progresiva

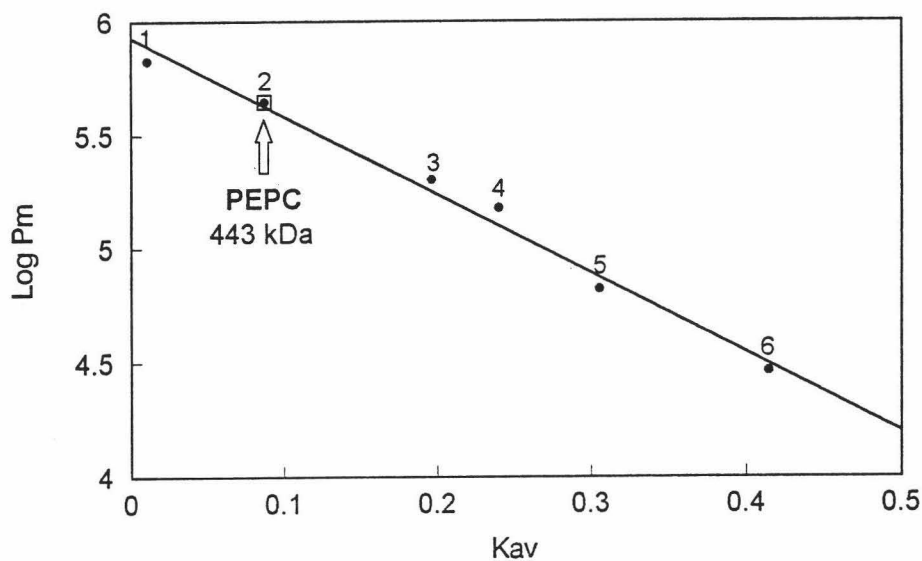


Fig. 5.4. Determinación del peso molecular nativo de la fosfoenolpiruvato carboxilasa nodular mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-300. Marcadores: (1) tiroglobulina (669 kDa), (2) apoferritina (443 kDa), (3) β -amilasa (200 kDa), (4) alcohol deshidrogenasa (150 kDa), (5) albúmina bovina (66 kDa) y (6) anhidrasa carbónica (29 kDa).

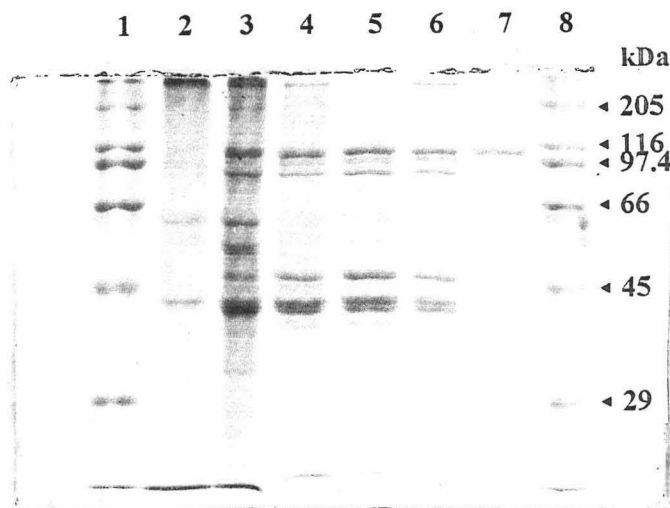


Fig. 5.5. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones obtenidas en la purificación parcial de la PEPC nodular de *Vicia faba* expuestas en la tabla 5.1. Carriles 1 y 8, marcadores de peso molecular; carril 2, extracto crudo (30 μ g de proteína); carril 3, precipitación con sulfato amónico (35 μ g de proteína); carril 4, DEAE-sefarosa (15 μ g de proteína); carril 5, Q-sefarosa (10 μ g de proteína); carril 6, ultrafiltración (7 μ g de proteína); carril 7, Sephacryl-S300 (5 μ g de proteína).

eliminación de proteínas no deseadas y la concentración de la banda correspondiente a la PEPC. El peso molecular de la subunidad se estimó con ayuda de la recta de calibrado obteniéndose un peso molecular de aproximadamente 113 ± 1.6 kDa (Fig. 5.6). Estos resultados apoyan la estructura homotetramérica de la PEPC.

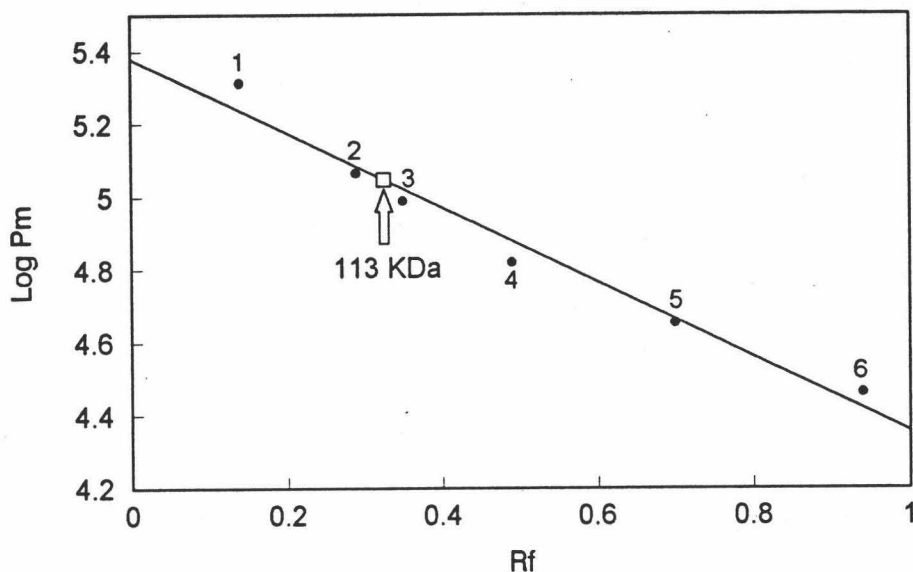


Fig. 5.6. Determinación del peso molecular de subunidad de la PEPC mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida con SDS. Marcadores: (1) miosina (205 kDa), (2) β -galactosidasa (116 kDa), (3) fosforilasa b (200 kDa), (4) seroalbúmina bovina (66 kDa), (5) ovoalbúmina (45 kDa) y (6) anhidrasa carbónica (29 kDa).

5.2.2. Efecto del pH.

La actividad PEPC se representó en función del pH (Fig. 5.7). La actividad purificada se ensayó en presencia de una concentración saturante de PEP (4 mM) a diferentes valores de pH entre 6.5 y 10.5). La máxima actividad se detectó a pH 8.25, si bien las diferencias entre 8.0 y 8.5 no fueron significativas. Los resultados fueron prácticamente iguales a las dos temperaturas ensayadas. La actividad máxima a 25°C fue del orden de un 70% de la máxima obtenida a 30°C.

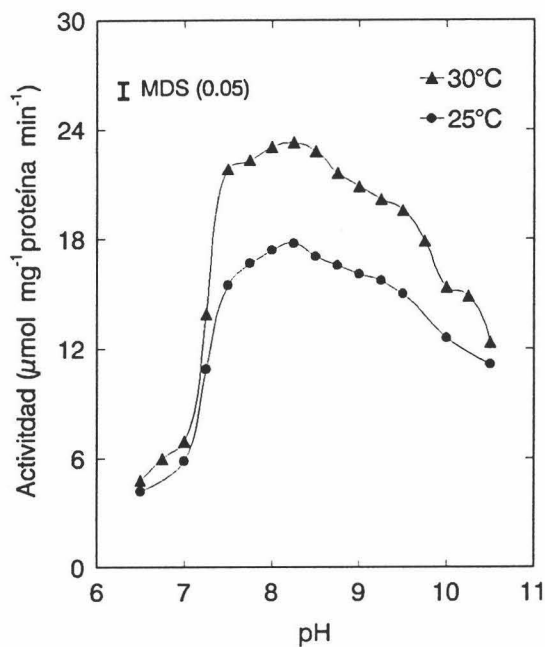


Fig. 5.7. Efecto del pH sobre la actividad PEPC parcialmente purificada de nódulos radicales de *V. faba* a 25°C (●) y 30°C (▲).

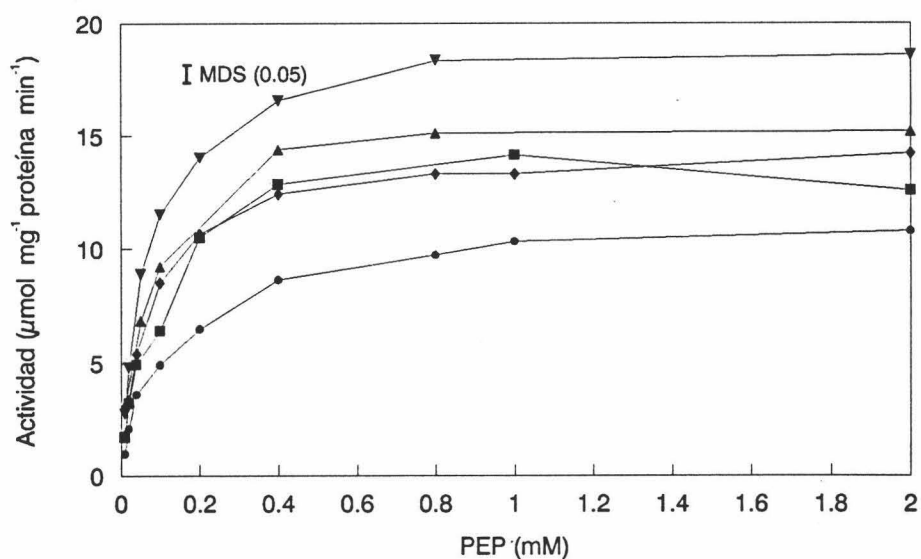


Fig. 5.8. Curvas de saturación con PEP de la actividad PEPC parcialmente purificada de nódulos radicales de *V. faba* a pH 6.5 (●), 7.0 (■), 7.5 (▲), 8.25 (▼) y 9.5 (◆).

5.2.3. Cinética de saturación con el substrato (PEP).

La cinética de saturación con PEP fue estudiada a cinco valores de pH (6.5, 7.0, 7.5, 8.25 y 9.5) usando las soluciones tampón indicadas en material y métodos. En todos los casos, se encontró una cinética típica de Michaelis-Menten a lo largo de las concentraciones de PEP utilizadas. Los datos fueron representados por medio de la ecuación de regresión no lineal de Michaelis-Menten (Fig. 5.8) con la ayuda del programa Enzfitter (Elsevier, Biosoft) el cual se usó también para calcular los valores de $K_m(\text{PEP})$ que se representan en la figura 5.9.

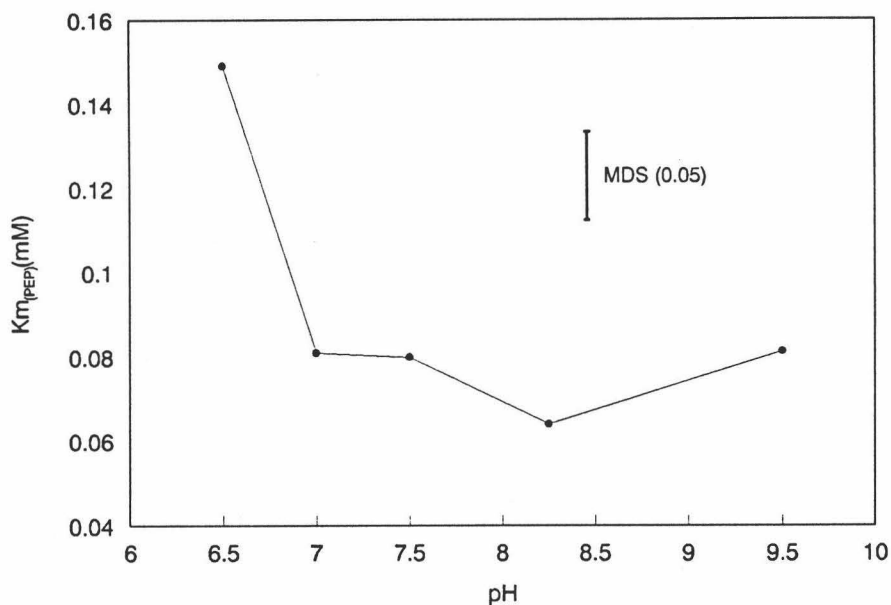


Fig. 5.9. Valores de $K_m(\text{PEP})$ en función del pH, a 25°C, de la PEPC parcialmente purificada de nódulos radicales de *V. faba*.

La $K_m(\text{PEP})$ a pH óptimo (8.25) fue $0.064 \text{ mM} \pm 0.002$. A pH 7, 7.5 y 9.5 se obtuvo un valor de $0.08 \text{ mM} \pm 0.002$ pero este valor no presentó diferencias significativas con el obtenido al pH óptimo. A pH 6.5 el valor obtenido para $K_m(\text{PEP})$ fue significativamente mayor ($0.15 \text{ mM} \pm 0.016$). La mínima diferencia significativa (MDS) entre medias fue 0.022 para $P < 0.05$.

5.2.4. Activación por la glucosa-6-fosfato.

La tabla 5.2 muestra como afectan las concentraciones crecientes de glucosa-6-P (0, 0.1, 0.5, 1, 3 y 5) a la actividad de la PEPC medida a dos valores de pH (7.0 y 8.25) en presencia de una concentración de PEP subsaturante (0.1 mM) y dos concentraciones saturantes (1.0 mM y 4.0 mM). A pH 7.0 la actividad enzimática aumenta con la concentración de glucosa-6-P hasta 1 mM y a partir de esta concentración la actividad PEPC se mantiene prácticamente constante a cualquier concentración de PEP utilizada. La estimulación de la actividad fue del 34, 27 y 70 % respectivamente a las tres concentraciones de PEP utilizadas. Sin embargo, a pH 8.25 no se detectó efecto activador alguno de la glucosa-6-P.

Tabla 5.2. Efecto de la glucosa-6-P sobre la actividad PEPC parcialmente purificada de nódulos radicales de *V. faba* (U mg⁻¹ proteína) a pH 7.0 y 8.25, 25°C y 0.1, 1 o 4 mM de PEP. N.D.= no determinado.

[G6P] mM	[PEP] mM (pH 7)			[PEP] mM (pH 8.25)	
	0.1	1	4	0.1	4
0	7.0	12.0	7.4	9.1	17.4
0.1	8.3	14.3	8.0	8.9	17.4
0.5	8.8	15.5	11.9	N.D.	N.D.
1	9.2	15.4	12.6	9.2	17.0
3	9.6	16.0	12.6	N.D.	N.D.
5	9.4	15.2	12.6	9.5	17.0
MDS (P<0.05) 0.6					

5.2.5. Inhibición por el malato.

El efecto inhibitor del malato sobre la actividad PEPC resultó ser fuertemente dependiente del pH (Fig. 5.10). El efecto de este ácido dicarboxílico sobre la actividad enzimática fue ensayado a pH 7.0 y 8.25 encontrándose una drástica diferencia entre los dos valores de pH. A pH 7.0 la actividad PEPC fue muy sensible a la inhibición por el malato. A este pH el 50 % de inhibición aparece con una concentración de 0.47 mM de malato (IC₅₀) mientras que a pH 8.25 aparece aproximadamente a 140 mM, lo que supone unas 300 veces más.

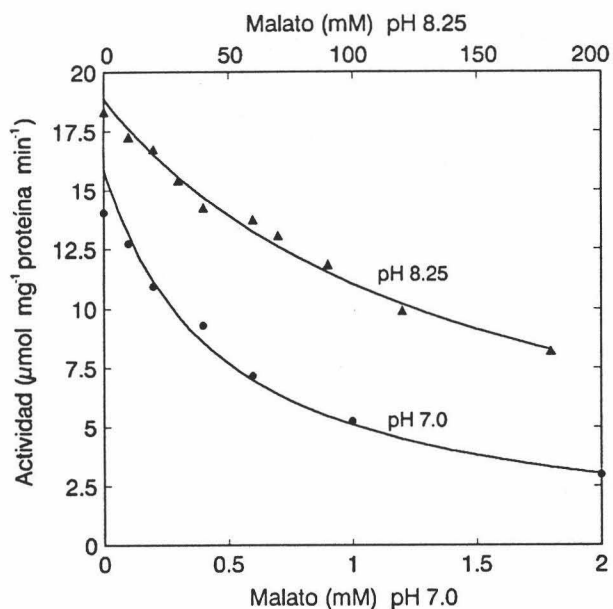


Fig. 5.10. Efecto de la concentración de malato sobre la actividad PEPC parcialmente purificada de nódulos radicales de *V. faba* a pH 7.0 (●) y 8.25 (▲), a 25°C. La escala de la concentración de malato a pH 8.25 está multiplicada x100.

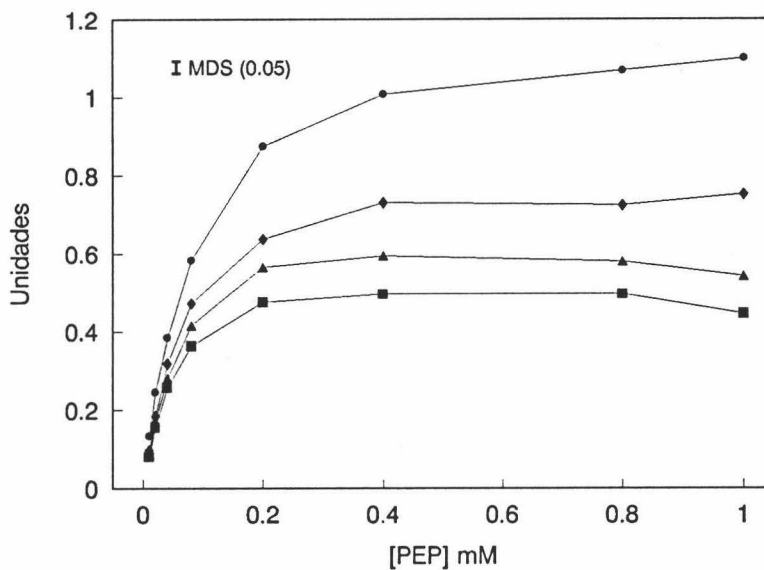


Fig. 5.11. Curvas de saturación con PEP sin (●) y con 0.2 (◆), 0.4 (▲) y 0.6 (■) mM de malato en la mezcla de reacción a pH 7.0, 25°C, de la actividad PEPC de nódulos radicales de *V. faba*

A fin de estudiar el tipo de inhibición que produce el malato sobre la actividad PEPC se realizaron curvas de saturación con PEP a pH 7.0 y en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (0, 0.2, 0.4 y 0.6 mM). Las curvas resultantes se representan en la figura 5.11. Los datos obtenidos para la velocidad máxima y la K_m se exponen en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Efecto de la concentración de malato sobre la K_m (PEP) (mM) y la V_{max} (U) de la actividad PEPC del citosol nodular de *V. faba* a pH 7.0 y 25°C

	[Malato] (mM)			
	0	0.2	0.4	0.6
K_m	0.080±0.003	0.060±0.005	0.046±0.008	0.041±0.006
V_{max}	1.20±0.012	0.808±0.015	0.628±0.03	0.526±0.02

El valor de K_m obtenido sin inhibidor coincide con el que se expone en el apartado 5.2.3. Al aumentar la concentración de malato el valor de K_m va disminuyendo. Los valores de la V_{max} disminuyen con el aumento de la concentración de inhibidor, reduciéndose en más del 50% con 0.6 mM de malato, lo que concuerda con el valor de la IC_{50} obtenido.

En la figura 5.12 se representan los gráficos de Lineweaver-Burk obtenidos representando los inversos de los datos de la figura anterior. Estos datos demuestran que el malato produce un tipo de inhibición mixto. Los valores de las dos constantes de inhibición son 1.14 mM ± 0.06 para $K_i(s)$ y 0.72 mM ± 0.04 para $K_i(i)$, siendo $i(s)$ y $K_i(i)$ las constantes de disociación del complejo ESI y EI respectivamente.

5.2.6. Efecto conjunto de la glucosa-6-P y el malato.

El efecto combinado de glucosa-6-P y malato se muestra en la tabla 5.4 en la que los resultados se han expresado como porcentaje respecto a un control sin activador e inhibidor. Estos ensayos se realizaron a pH 7 al cual ambos efectores mostraron su mayor actividad. La glucosa-6-P revierte el efecto inhibitor del malato sobre la actividad PEPC a concentraciones iguales de ambos efectores e incluso siendo la concentración del activador menor que la del inhibidor. Así, una concentración de

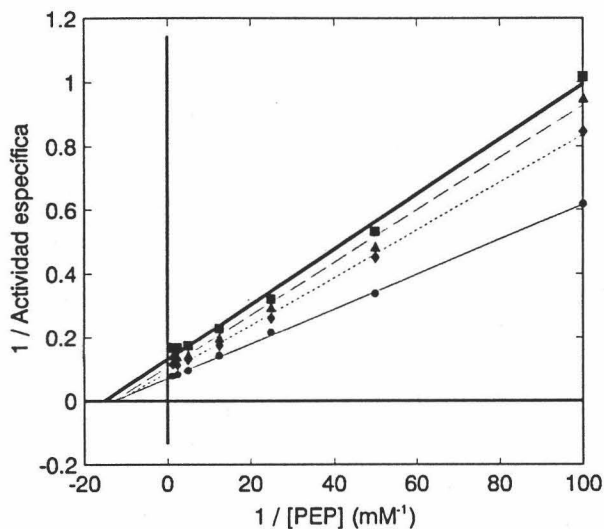


Fig. 5.12. Representación de Lineweaver-Burk de las curvas de saturación con PEP de la actividad PEPC nodular de *V. faba* parcialmente purificada sin (—●—) y con 0.2 (—◆—), 0.4 (—▲—) y 0.6 (—■—) mM de malato en la mezcla de reacción a pH 7.0 y 25°C. La actividad específica se expresa en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína min}^{-1}$.

0.1 mM de malato produjo un 12% de inhibición mientras que en presencia de 0.1 mM de glucosa-6-P esta inhibición se redujo a solo un 3%. La utilización de 0.4 mM del inhibidor causó una inhibición del 34%, reduciéndose al 8% en presencia de 0.1 mM del activador. Finalmente, en presencia de 1 mM de malato la actividad PEPC se inhibió en un 62%. Esta inhibición se redujo hasta el 25% en presencia de 0.1 mM de glucosa-6-P y hasta solo el 4% cuando en el medio había una concentración del activador de 0.4 mM.

Tabla 5.4. Efecto combinado del malato y la glucosa-6-P sobre la actividad PEPC parcialmente purificada de nódulos radicales de *V. faba*. Los ensayos se realizaron a pH 7.0 y 1 mM PEP. La actividad se expresa como porcentaje respecto al control sin malato ni glucosa-6-P.

[G6P] (mM)	[L-malato] (mM)			
	0	0.1	0.4	1.0
0	100	88	66	38
0.1	119	97	92	75
0.4	127	103	99	94

V. Discusión

V. DISCUSIÓN.

En *Vicia faba* cv. Alborea, la acumulación de materia seca mostró una alta correlación con PSN y ARA por planta como describen Buttery y Gibson (1990) para *Pisum sativum* y Awan (1994b) para *Lens culinaris*. Aunque en este experimento se adicionó nitrógeno (2 mM KNO₃) a la solución nutritiva, la mayoría del nitrógeno asimilado por la planta procede de la fijación simbiótica, como demostraron Hervás *et al.* (1991).

El ARA de los nódulos alcanzó el máximo en la tercera semana después de la inoculación cuando los nódulos están bien formados. Más tarde, se puede observar otra zona de máximo desde el inicio de la floración y durante este periodo. A continuación el peso fresco de nódulos sigue aumentando pero el ARA disminuye. Esto sugiere que el descenso gradual en la actividad específica, que puede ser explicado por el aumento en la proporción de tejido no fijador en el nódulo, tras 7 semanas se continua con un proceso de degradación más rápido (Vikman y Vessey, 1993). Resultados parecidos se han informado para lentejas (Awan, 1994), trébol (Vessey y Patriquin, 1984), alfalfa (Wery, 1986) y guisante (LaRue y Kurz, 1973; Suganuma *et al.*, 1993; Bethlenfalvay *et al.*, 1978). Sin embargo, se han descrito tendencias diferentes para soja (Thybodeau y Jaworsky, 1975).

La actividad nitrogenasa total por planta (ARAP) expresada en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_2 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, aumento hasta los 48 días en que el aumento de masa nodular se detiene. Desde los 48 días hasta los 52 la masa nodular no cambió, pero ARAP comenzó a disminuir porque la legumbre anual entra en un estado de senescencia general (monocarpica) (Kawai y Kumazawa, 1982).

La producción de H₂ se correlaciona con ARA. La producción de hidrógeno durante la reducción enzimática de dinitrógeno a amonio es uno de los principales factores que influyen en la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno (Schubert y Evans, 1976). Estos autores definen la eficiencia relativa de la fijación de nitrógeno como un parámetro para evaluar el significado de la producción de H₂ por la nitrogenasa.

Los valores de eficiencia relativa obtenidos en este estudio están en el rango de 0.5 a 0.8 y esta variación depende del estado de desarrollo de la planta (Bethlenfalvay y Phillips, 1977). Otros factores como el sistema hidrogenasa para reciclar el H₂ producido (Dixon, 1978) y ambientales pueden influir en la ER. En ausencia de actividad hidrogenasa (fenotipo Hup⁻) la ER presumiblemente es una medida del sustrato exógeno aparentemente reducido (Edie y Phillips, 1983).

Nuestros resultados son similares en general a los obtenidos en nódulos de especies tropicales arbóreas (van Kessel *et al.*, 1983), de guisantes (Skot, 1983) y otras legumbres (Hansen *et al.*, 1978). Asumiendo una actividad hidrogenasa despreciable, los datos obtenidos en este estudio sugieren que del 20 al 40% del flujo de electrones a través de la nitrogenasa de los nódulos de *Vicia faba* se emplearían en la producción de hidrógeno. Esta significativa pérdida de energía está en el mismo rango de los valores obtenidos para preparaciones de nitrogenasa libres de células (Schubert y Evans, 1976). La magnitud de la producción de H₂ varió durante el ciclo de crecimiento y los cambios están fuertemente correlacionados con los de ARA. Por tanto, la eficiencia relativa de la fijación de nitrógeno varió a lo largo del crecimiento, con valores máximos coincidiendo con los momentos de fijación más baja y valores mínimos en los momentos de mayor tasa de fijación de N₂. ER fue constante hasta el final de la tercera semana después de la siembra. A continuación, su descenso coincide con el inicio de la floración y aumenta de nuevo al comienzo del llenado de la vaina. Estas variaciones se atribuyen al cambio en el reparto del flujo de electrones entre reducción de N₂ y producción de H₂ y a cambios en la actividad hidrogenasa (Rainbird *et al.*, 1983). Estos datos se podrían interpretar como una relación de la ER con las reservas de C adecuadas. El aumento de la ER con la edad de la planta y con los valores más altos de TCR en este trabajo, apoyan esta idea. Sin embargo, Imsande (1989) sugiere que los carbohidratos están en exceso al inicio del crecimiento reproductivo pues el aparato fotosintético está en su máximo desarrollo en este periodo y el mayor crecimiento ha disminuido. También, durante el crecimiento reproductivo la respiración nodular permanece alta (Vikman y Vessey, 1993b) y las enzimas del metabolismo carbonado están activas.

Los datos de RPA en este experimento y en los de Ryle *et al.* (1992) no apoyan un aumento de las reservas de C localizadas en el sistema radical, como mecanismo que influye en la ER en plantas de *Vicia faba*, como resultado de un descenso en la tasa de reutilización del H₂ (Bethlenfalvay y Phillips, 1979). Sin embargo en ambas simbiosis la relación no fue constante, indicando que la ER de la fijación de N₂ y el coste en términos de sustrato oxidable utilizado puede variar dependiendo del estado de desarrollo y de la tasa de fijación.

Esta investigación ha mostrado que ambas invertasa alcalina y sacarosa sintasa están presentes en nódulos de *Vicia faba*. La sacarosa sintasa parece ser la principal enzima implicada en la hidrólisis de la sacarosa en los nódulos, pues la actividad potencial de la SS en el citosol vegetal fue aproximadamente el doble que la de la IA

a lo largo del crecimiento y desarrollo de los nódulos de *Vicia faba*. En contraste la actividad específica de la IA juega un papel importante en la hidrólisis de la sacarosa en soja (Copeland *et al.*, 1995). Nuestros datos revelan que la actividad SS durante los cambios ontogenéticos fue dos veces más activa que la IA. También podemos observar dos fases distintas del desarrollo. Durante primera fase del crecimiento la SS aparece como la actividad hidrolítica de la sacarosa dominante, mientras que en el periodo reproductivo la actividad IA incrementa significativamente su proporción. La actividad relativa de ambas enzimas varía con el estado de desarrollo (Huber e Israel, 1982; Xu *et al.*, 1989). La SS muestra un pico cuando la fijación de N₂ ha alcanzado el máximo. Es difícil encontrar una explicación a este comportamiento. Hay que notar, sin embargo que en esta fase comienza el aporte de fotosintato al nódulo. El tamaño del "pool" de metabolitos como la sacarosa apoyan esta idea (Vikman y Vessey, 1993; Kawai y Kumazawa, 1982).

La sacarosa sintasa es una proteína constituida por cuatro subunidades que controla el metabolismo y el suministro del carbono a los bacteroides. Emerich *et al.* (1988) sugiere que la hidrólisis de la sacarosa por la sacarosa sintasa podría ser ventajosa cuando la disponibilidad de carbono es limitada ya que la conversión de la sacarosa en triosa fosfato requiere solo 3 moléculas de ATP (Huber y Akawara, 1986) mientras que la hidrólisis con invertasa utiliza 4 moléculas de ATP. Además este enzima deja de ser activo cuando se interrumpe el suministro de carbono al bacteroide lo que, en condiciones fisiológicas, ocurre durante la senescencia del nódulo, habiéndose demostrado que el grupo hemo de la leghemoglobina es el responsable de su inhibición (Verma *et al.*, 1988).

La UDP-glucosa producida por la sacarosa sintasa puede actuar de precursor de otros azúcares-nucleótidos y de ciertos polisacáridos. De hecho un porcentaje significativo se transforma en almidón que se almacena en amiloplastos de células infectadas y no infectadas. Probablemente es una forma de almacenar energía y carbono para periodos de estrés de fotosintato (Meller *et al.*, 1989). Alternativamente, puede convertirse en glucosa-1P por UDP-glucosa pirofosforilasa (Salminen y Streeter, 1986; Copeland *et al.*, 1989b). La disponibilidad de pirofosfato va a determinar la formación de glucosa-1P y por tanto los cambios en la concentración de substratos (Vella y Copeland, 1990).

Durante la fase más activa de TCR la actividad SS es muy alta, disminuyendo

la capacidad de catabolismo de la sacarosa con el descenso de la TCR al aumentar la edad de los nódulos.

Muchos tejidos no fotosintéticos de las plantas, incluyendo las raíces y nódulos de especies fijadoras de nitrógeno como *Lupinus albus* (Layzell *et al.*, 1979) *Vicia faba* (Lawrie y Wheeler, 1975) *Pisum sativum* (Minchin y Pate, 1973) *Phaseolus vulgaris* (Cookson *et al.*, 1980) *Glycine max* (Coker y Schubert, 1980) y *Alnus glutinosa* (Schubert y Coker, 1981) poseen un activo sistema para la asimilación de CO₂. En estudios previos (Hardy y Havelka, 1977) PEPC aparece como la principal enzima responsable de la fijación de CO₂ en estos tejidos. En los experimentos presentados aquí se demuestra que los nodulos de habas poseen un sistema activo de fijación de CO₂.

Esta actividad enzimática no mostró correlación significativa con la fijación de nitrógeno, al contrario que en nódulos de *Lupinus* (Cristeller *et al.*, 1977). Estos autores propusieron que el principal papel de la fijación de CO₂ era la producción de esqueletos carbonados para la síntesis de aspartato y asparragina, la forma predominante de nitrógeno orgánico en el exudado del xilema en *Lupinus*. Davies (1979) sugirió que la actividad combinada de la PEPC y de la MDH puede servir como un mecanismo de regulación del pH intracelular al encontrar una correlación significativa entre ambas enzimas. Los datos obtenidos en el presente trabajo establecen que PEPC y MDH están presentes en *Vicia faba* a niveles apreciables de actividad, comparables a los medidos en nódulos de *Pisum sativum* (Smith, 1985) y *Lupinus angustifolius* (Laing *et al.*, 1979). PEPC mostro mayor actividad en el nódulo (Suganuma y Yamamoto, 1987) lo que sugiere que la fijación oscura de CO₂ es activa en citosol nodular de habas y el producto metabólico, malato, es usado como fuente de carbono para la fijación de nitrógeno (de Vries *et al.*, 1980). Nuestros datos muestran que el desarrollo del nódulo va acompañado por marcados cambios en las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo del malato. El AOA producido por la PEPC puede ser facilmente convertido a malato ya que la actividad MDH es muy alta.

La actividad de ambas enzimas aumentó gradualmente en habas durante el desarrollo. El máximo se presentó durante la floración antes del máximo nivel de reducción de C₂H₂. Desde la formación de la vaina, ambas actividades descendieron de igual manera. La fuerte correlación observada en nódulos de soja entre la fijación de CO₂ y la actividad nitrogenasa (Roumet *et al.*, 1990) no se observó en este trabajo con *Vicia faba* o con nódulos de *Pisum sativum* (Suganuma *et al.*, 1993).

Los extractos solubles del citosol de nódulos de habas contienen las actividades enzimáticas de la vía de las pentosas fosfato glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). Esta es una ruta alternativa para la hidrólisis de los carbohidratos que funciona principalmente para generar NADPH+H⁺ y precursores biosintéticos como la ribosa 5-fosfato y la eritrosa 4-fosfato (Copeland y Turner, 1987). Como en otras actividades enzimáticas hemos observado dos fases, una antes de la floración, relacionada con el máximo de fijación de N₂ y otra durante la floración e iniciación de la vaina. Ambas enzimas mostraron una correlación significativa (--dato--). Las actividades específicas de estas enzimas fueron similares a las encontradas en *Pisum sativum*, *Lupinus albus* y *Cajanus cajan* (Hong y Copeland, 1990).

La presencia de NADP-isocitrato deshidrogenasa citosólica en nódulos de habas también se ha observado en nódulos de otras leguminosas (Henson *et al.*, 1986; Kurz y LaRue, 1977; Sing *et al.*, 1994) y sugiere la posibilidad de que el 2-oxoglutarato se produce en el propio citosol. Tradicionalmente se ha considerado la NAD-ICDH la enzima responsable de suministrar 2-oxoglutarato como intermediario del ciclo de Krebs y para la síntesis de glutamato (Meteler, 1977; Weger *et al.*, 1988) mientras que la NADP-ICDH parece estar implicada en la producción de NADPH para las reacciones biosintéticas en el citosol (Chenet *et al.*, 1988). Sin embargo, nosotros proponemos que en nódulos de habas la NADP-ICDH citosólica probablemente funciona como suministradora de poder reductor y cetoácidos para la asimilación del amonio exportado de los bacteroides. Resultados similares han sido confirmados por Nautiyal y Modi (1987) y Gupta y Sing (1981).

La fosfoenolpiruvato carboxilasa ha sido parcialmente purificada del citosol nodular de *Vicia faba*. La actividad PEPC eluyó en un único pico con todas las técnicas cromatográficas utilizadas. Esto concuerda con trabajos previos en *Glycine max* (Peterson and Evans 1979) y *Medicago sativa* (Vance and Stade 1984), pero contrasta con los resultados obtenidos en nódulos de *Phaseolus vulgaris* y *Lupinus luteus*, en los que se han podido separar dos isoformas de PEPC mediante cromatografía de intercambio iónico (Deroche *et al.*, 1983; Marczewsky, 1989).

La enzima tiene una estructura homotetramérica, compuesta por cuatro subunidades de 113 kDa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nódulos de alfalfa (Miller *et al.* La enzima de nódulos de soja también parece ser un homotetramero con subunidades de 100 kDa (Schuller *et al.* 1990). En nuestro trabajo la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS produjo una banda de proteína

correspondiente a una masa molecular de 113 kDa. El peso molecular nativo de la PEPC de nódulos de habas se ha estimado en 443 kDa. La preparación final de la enzima resultó purificada 56.3 veces respecto al extracto crudo, con una actividad específica de 24.8 unidades mg^{-1} proteína. El factor de purificación es superior al obtenido para la PEPC de nódulos de soja y alfalfa, pero la actividad específica es solo un 60% de la obtenida en PEPC de nódulos de alfalfa, aunque es cinco veces superior a la obtenida en nódulos de soja (Vance and Stade 1984; Peterson and Evans 1979).

La actividad PEPC mostró un pH óptimo a 8.25, con una actividad menor a la mitad a pH 7.0 o 9.0. Este pH óptimo es diferente del encontrado para la enzima de nódulos de *Lupinus* y de alfalfa (Cristeller et al. 1977; Vance y Stade 1984) pero se aproxima al rango de pH óptimo indicado por Lepiniec et al. (1994). En otros tejidos de *Vicia faba*, la PEPC es más efectiva a pH 8.5 (Denecke et al. 1993).

En este trabajo se han analizado los valores de $K_m(\text{PEP})$ en el rango de pH de 6.5 a 9.5. El valor de $K_m(\text{PEP})$ value al pH óptimo (8.25) para la enzima de nódulos de *Vicia faba* (0.064 mM) es similar al valor encontrado para la PEPC I de nódulos de *Lupinus* (Marczewski, 1989) y al valor de la PEPC de nódulos de soja (Schuller et al. 1990). La $K_m(\text{PEP})$ mostró un incremento significativo a pH 6.5, más del doble del valor a pH 8.25, indicando una drástica caída en la afinidad por el sustrato. Este comportamiento sugiere la implicación de aminoácidos específicos en la interacción del PEP con la PEPC en el centro activo en el cual una carga neta positiva es la responsable de este efecto.

La actividad PEPC es sensible a varios metabolitos alostéricos (Lepiniec et al. 1994). La glucosa-6-P es bien conocida como activador efectivo de la PEPC (Wedding et al. 1989). Los niveles relativamente bajos de PEP que se han usado en este trabajo proporcionan unas condiciones excelentes para la expresión de la activación por la glucosa-6-P. Esta molécula no tuvo efecto alguno a pH 8.25. Coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio, Tarczynski and Outlaw (1993) también informan que este metabolito es más efectivo a pH 7.0 que al pH óptimo (8.25) al que la PEPC es más eficiente. Los valores obtenidos para la activación de la enzima por la glucosa-6-P en presencia de bajas concentraciones de PEP, muestran que la glucosa-6-P puede ser un importante modulador fisiológico de la PEPC. Esta enzima, localizada en la fracción citosólica de los nódulos de las leguminosas juega un papel clave en la síntesis de ácidos orgánicos que son absorbidos por los bacteroides y usados como sustratos respiratorios para suministrar la energía a la nitrogenasa (Anderson et al. 1987; King et al. 1986) entre otras funciones (Deroche and Carrayol 1989; Rosendahl et al. 1990).

Por tanto, la activación de la PEPC por la hexosa-P puede coordinar la disponibilidad de sacarosa con la tasa de síntesis de ácidos dicarboxílicos (Schuller et al. 1990).

La inhibición de la actividad PEPC por el malato ha sido estudiada con anterioridad (O'Leary 1982). La enzima manifiesta una modulación por el malato como inhibidor dependiente del pH, pues fue más efectivo a pH 7.0 que a 8.25. Resultados similares se han obtenido en nódulos de *Lupinus* (Marczewski 1989). Efectos análogos han sido obtenidos para el malato y la glucosa-6-P en la PEPC de plantas C4 (Andreo et al. 1987) y otras especies (Podestá and Plaxton 1994). En este trabajo, la IC_{50} a pH 7.0 fue unas 300 veces menor que a pH 8.25. Estos datos coinciden con los de Schuller et al. (1990). Los efectos principales del malato sobre los parámetros cinéticos de la PEPC han sido bien documentados (Wedding et al. 1994) y la disminución de la velocidad máxima y el aumento de K_m han sido confirmados en este trabajo.

En general, bajas concentraciones (0.3 mM) de malato inhibe la PEPC de nódulos de *Vicia faba* más que otras PEPCs, aunque se ha descrito un rango muy amplio de efectos (Tarczynski and Outlaw 1993). Cinco milimolar cae dentro del rango de concentración estimado para el malato en el citoplasma de las plantas (Bodson et al. 1991).

Para determinar el tipo de inhibición a pH 7.0, se midió la actividad PEPC a diferentes concentraciones de PEP y de malato, representándose los resultados por medio del gráfico de Lineweaver-Burk, que mostró una inhibición de tipo no competitivo mixto. Sin embargo, Marczewski (1989) describió la inhibición de la PEPC de nódulos de *Lupinus* por el malato como competitiva. Resultados parecidos fueron obtenidos por Denecke et al. (1993) en PEPC de estomas de *Vicia faba*. En nódulos de soja, la PEPC está sujeta a una inhibición "feed-back" por el malato bajo condiciones subóptimas pero fisiológicamente importantes, como pH 7.0 y concentraciones subsaturantes de PEP (Schuller et al. 1990) aunque estos autores no analizaron el tipo de inhibición.

El efecto de la glucosa revirtiendo la inhibición de la PEPC por el malato, ha sido estudiado por varios autores. Krömer et al. (1996) informan que la activación por la glucosa revierte la inhibición por el malato en alfalfa. Denecke et al. (1993) y Notton y Blanke (1993) describieron este efecto usando concentraciones de glucosa-6-P más altas que de malato. Tarczynski and Outlaw (1993) usó concentraciones similares de ambos efectores y, en algunos casos, concentraciones más bajas de glucosa-6-P que

de malato. En el presente trabajo se ha obtenido que concentraciones de glucosa-6-P más bajas o iguales que de malato, revierten la inhibición de la actividad PEPC. Este efecto fue más pronunciado a pH 7 y concentraciones de ambos efectores 1 mM o inferiores, lo que podría indicar que la interacción de ambos compuestos puede constituir un mecanismo importante en la regulación de esta enzima en *Vicia faba* en condiciones fisiológicas.

VI. CONCLUSIONES

1. El genotipo de la planta huésped parece ser el principal factor determinante de la eficiencia en la fijación de nitrógeno en la simbiosis de *Vicia faba*-*Rhizobium leguminosarum*. En esta simbiosis se observa una capacidad de compensación entre la actividad nitrogenasa y la masa nodular, de manera que la fijación de nitrógeno total mantenga un nivel adecuado para el desarrollo de la planta, lo que supone una ventaja adaptativa de la planta en relación a las diversas cepas de *Rhizobium* autóctonas en distintos suelos.
2. En *Vicia faba* las enzimas del metabolismo carbonado y, especialmente, las del metabolismo de la sacarosa y de la vía de las pentosas-fosfato, pusieron de manifiesto la diferencia entre los dos periodos, vegetativo y reproductor definiendo claramente el límite entre ambos como un momento en el que los niveles de dichas actividades muestran un cambio significativo. Durante el período vegetativo la SS es la encargada de metabolizar prioritariamente la sacarosa en el nódulo de *Vicia faba*. En el período reproductor el papel de la IA adquiere mayor importancia al aumentar su actividad y disminuir la SS.
3. *Vicia faba* no presentó diferencias en el crecimiento con las dos concentraciones de nitrato utilizadas, lo que indica que su eficiencia fijadora le permite una menor dependencia del nitrato. El nitrato del medio es capaz de actuar sobre la fijación de nitrógeno total por planta reduciendola a corto plazo, 24 horas, inhibiendo la actividad nitrogenasa específica y, a más largo plazo, inhibiendo el crecimiento de la masa nodular. En cualquier caso *Vicia faba* presenta una buena adaptación al nitrógeno combinado del medio.
4. *Phaseolus vulgaris* mostró una alta dependencia del nitrato al poseer una capacidad fijadora de nitrógeno limitada. Por otra parte, la sensibilidad al nitrato se manifestó en una fuerte inhibición de la ARA al aplicar el nitrato al final del periodo vegetativo, así como en una disminución del PSN en los dos tratamientos. Uno de los factores determinantes de la menor eficacia en la fijación de nitrógeno de esta especie estaría relacionado con la menor actividad de algunas enzimas del metabolismo carbonado nodular, concretamente con las enzimas de la degradación de la sacarosa y de la vía de las pentosas-fosfato.

5. a). La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa fue purificada en un factor de 56.3 veces a partir de nódulos de *Vicia faba*, calculándose un PM de 443 kD con técnicas no desnaturalizantes y un PM de 113 kD para las subunidades por medio de SDS-PAGE. Esto está de acuerdo con los resultados para otras especies. No se pudo evidenciar la existencia de isoenzimas por ninguna de las técnicas utilizadas.
- b). La K_m de esta enzima es de 0.064 mM para el PEP a pH 8.25, no encontrándose diferencias significativas entre pH 7 y 9.5. A pH inferiores (6.5) La K_m aumentó significativamente.
- c). El estudio de la inhibición por el malato, demostró que se trata de un inhibidor de tipo mixto con una K_i que depende del pH. La inhibición más drástica se produce a pH 7, necesiándose niveles muy altos de malato para conseguir la inhibición a pH óptimo. La activación por la glucosa-6-P también depende del pH encontrándose buenos niveles de activación a pH 7 y no manifestando activación alguna al pH óptimo (8.25). La reversión del efecto inhibitor del malato por la glucosa-6-P a concentraciones inferiores a 1 mM y a pH 7 indica que la interacción de ambos efectores puede ser un mecanismo importante en la regulación de esta actividad enzimática en condiciones fisiológicas.

VII. Bibliografía

Albreche, W.A. and Davis, F.L. (1929) Physiological importance of Ca^{2+} in legume inoculation. Bot. Gaz. (Chicago), **88**: 310-321.

Allen, O.N. y Allen, E.K. (1981) The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. Wisconsin. The University of Wisconsin Press, Madison. 812 pp.

Andreo, C.S. González, D.H. e Iglesias, A.A. (1987) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. FEBS Lett. **213**: 1-8.

Anthon, G.E. y Emerich, D.W. (1990) Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. Plant Physiol. **92**: 346-351.

Antoniw, L.D. y Sprent, J.I. (1978) Primary metabolites of *Phaseolus vulgaris* nodules. Phytochem. **17**: 675-678.

Appelbaum, E. (1990) The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-Legume Symbiosis. En: Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 131-151.

Appleby, C.A. (1984). Leghemoglobin. En: The Biology of Nitrogen Fixation. A. Quispel (ed.). North Holland, Amsterdam, pp. 521-554.

Arwas, R.; McKay, I.A.; Rowney, F.R.P., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R. (1985) Properties of organic acid utilization mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 300. J. Gen. Microbiol. **131**: 2059-2066.

Barrera, A.R. y Jurtshuk, P. (1970) Characterization of the highly active isocitrate (NADP+) dehydrogenase of *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Biophys. Acta, **220**: 416-429

Bassarab, S.; Mellor, R.B. y Werner D. (1986) Evidence for two types of Mg^{++} -ATPase in the peribacteroid membrane from *Glycine max* root nodules. Endocyt C. Res. **3**: 189-196.

Becana, M.; Minchin, F.R. y Sprent, J.I. (1989) Short-term inhibition of legume N_2 fixation by nitrate. I Nitrate effects on nitrate-reductase activities of bacteroids and nodule cytosol. Planta **183**: 40-45.

Bergersen, F.J. y Turner, G.L. (1967) Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean nodules. Biochim. Biophys. Acta **141**: 507-515.

Bethlenfalvay, G.J.; Abu-Snakra, S.S. y Phillips, S (1978) Interdependence of nitrogen nutrition and photosynthesis in *Pisum sativum* L. I. Effect of combined nitrogen on symbiotic nitrogen fixation and photosynthesis. Plant Physiol. **62**: 127-130.

Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L. y Hetherington, D.R. (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**: 7342-7346.

Bishop, P.E. (1990) Genetics of alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. Resúmenes 8th International Congress on Nitrogen Fixation. Knoxville, Tennessee, USA. p. L-51.

Bisseling, T.; Franssen, H.; Govers, F.; Horwath, B.; Moerman, M.; Scheres, B.; van de Wield, C. y Yang, W.-C. (1991) Early nodulins in pea and soybean nodule development. En: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction. Vol. 1. H, Hennecke y D.P.S., Verma (eds.), pp. 300-303. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Bulen, W.A. y LeCompte, J.R. (1966) The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requirement for nitrogen reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hidrolisis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56: 979-984.

Burns, R.C. y Hardy, R.W.F. (1975) Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer, New York, pp. 121-132.

Caetano-Anollés, G. y Gresshoff, P.M. (1991) Alfalfa controls nodulation during the onset of *Rhizobium*-legume cortical cell division. Plant Physiol. 95: 366-373.

Cantrell, M.A.; Hickok, R.E. y Evans, H.J. (1982) Identification and characterization of plasmids in hydrogen uptake positive and hydrogen uptake negative strains of *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 131: 102-106.

Carlson, R.W. (1982) Surface chemistry, En: Nitrogen Fixation, Vol 2. *Rhizobium*, Broughton, W.J., Ed.. Claredon Press, Oxford, 199 pp.

Carlson, R.W.; Price, N.P.J. y Stayce, G. (1995) The biosynthesis of rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. Mol. Pl. Microbe Interact. 7: 684-695.

Chatt J., (1980) Chemistry relevant to the biological fixation of nitrogen. En: Nitrogen Fixation. W.P.D. Stewart y J.R. Gallon (eds). Academic Press. Londres, pp. 1-17.

Chen, W.X.; Li, G.H. y Qi, Y.L. (1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 275-280.

Chen, R.-D.; Maréchal, J.V.; Jacquot, J.P. y Gadal, P. (1988) Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (*Pisum sativum*) roots and green leaves. Eur. J. Biochem. 175: 565-572.

Chen, W.X.; Yan, G.H. y Li, J.L. (1988) Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 392-397.

Chen, R.-D.; Bismuth, E.; Champigny, M.L. y Gadal, P. (1989) Chromatographic and immunological evidence that chloroplastic and cytosolic pea (*Pisum sativum* L.) NADP-iscitrate dehydrogenase are distinct isoenzymes. *Planta* **178**: 157-163.

Clausen, H. y Hansen, V. (1968) Landökonomisk forsöglaboratorium. *Arsbog*, pp. 45-58. Landökonomisk forsöglaboratorium. Copenhagen.

Cook, D.; Dreyer, D.; Bonnet, D.; Howell, M.; Nony, E. y VandenBosch, K. (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago trunculata* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Pl. Cell* **7**: 684-695.

Cooker, R. y Schubert, K.R. (1981) Carbon dioxide fixation in soybean root and nodules. *Plant Physiol.* **67**: 691-696.

Copeland, L.; Vella, J. y Hong Z. (1989) Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochem.* **28**: 57-61.

Copeland, L. y Turner, J.F. (1987) The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol. 11. P.K. Stumpf y E.E. Conn (eds.), pp. 107-128. Academic Press, San Diego.

Copeland, L. y Zammit, A. (1994) Kinetic properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the host fraction of soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**: 107-113.

Cristeller, J.T.; Laing, W.A. y Sutton, W.D (1977) Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules. I. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiol* **60**: 47-50.

Cubero, J.I. y Suso, M.J. (1981) Primitive and modern forms of *Vicia faba*. *Z. Kulturpfl.* **29**: 137-145.

Danison, R.F. y Harter, B.L. (1995) Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. Nodule oximetry and computer modeling. *Plant Physiol.* **107**: 1355-1364.

Davies, D.D. (1980). Anaerobic metabolism and the production of organic acids. En: *The Biochemistry of plants: An advances Treatise*, ed. P. K. Stump, E. E. Conn. **2**: 581-611. New York: Academic (ISBN 0-12-675402-0).

Day, D.A. y Copeland, L. (1991) Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. *Plant. Physiol. Biochem.* **29**: 185-201.

Day, D.A.; Carroll B.J.; Delves, A.C. y Gresshoff, P.M. (1989) Relationship between autoregulation and nitrate inhibition of nodulation in soybeans. *Physiol. Plant.* **75**: 37-42.

Day, D.A. y Mannix, M (1988) Malate oxidation by soybean nodule mitochondria and the possible consequences for nitrogen fixation. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 567-573.

Day, D.A.; Ou Yang, L.-J. y Udvardi, M.K. (1990) Nutrient exchange across the peribacteroid membrane of isolated symbiosomes. En: Nitrogen fixation: Achievements and objectives. P.M. Gresshoff, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Chapman and Hall. New York.

De Vries, G.E.; Veld I. y Kijne, J.W. (1980) Production of organics acids in *Pisum sativum* root nodules as a result of oxygen stress. *Plant Sci. Lett.* **20**: 115-123.

De Vries, G.E.; E. Oosterwijk y J.W. Kijne (1983) Antigenic cross-reactivity between *Rhizobium leguminosarum* glutamine synthetase II and *Pisum sativum* root nodule glutamine synthetases. *Plant Sci. Letts* **32**: 333-341.

Delgado, M.J.; Ligeró, F. y Lluch C. (1993) Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.* **26(3)**: 371-376.

Deroche, M.E. and Carrayol, E. (1988) Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* **74**: 775-782.

Dilworth, M. y Glenn, A. (1984) How does a legume nodule work? *Trend in Biochem. Sci.* **9**: 519-523.

Dixon, R.O.D. (1968) Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Arch. Microbiol.* **85**: 272-283.

Dixon, R.O.D.; Berlier, Y.M. y Lespinat, P.A. (1981) Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soyabean and pea. *Plant Soil.* **61**: 135-143.

Dixon, R.O.D.; Berlier, Y.M. y Lespinat, P.A. (1981) Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soybean and pea. *Plant Soil* **61**: 135-143.

Dixon, R.O.D. (1972) Hydrogenase in legume root bacteroids: Occurrence and properties. *Arch. Microbiol.* **85**: 193-201.

Doebley, J. (1990) Isoenzymic evidence and the evolution of crop plants. En: Isozymes in plant biology. T.R. Dudley, D.E. Soltis y P.S. Soltis (eds). Chapman and Hall. Londres, pp. 165-191.

Dreyfus, B.; García, J.L. y Gillis, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 89-98.

Dreyfus, B.; García, J.L. y Gillis, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 89-98.

Dreyfus, B.; García, J.L. y Gillis, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 89-98.

Drossopoulos, J.B.; Bouranis, D.L. y Bairaktari, B.D. (1994) Patterns of mineral nutrient fluctuations in soybean leaves in relation to their position. *J. Plant Nut.* **17(6)**: 1017-1035.

Duke, S.H. y Henson, C.A. (1985) Legume nodule carbon utilization in the synthesis of organic acids for production of transport amides and amino acids. En: *Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism*, ed. P. W. Ludden, J. E. Burris, pp. 293-302. New York: Elsevier (ISBN 0-444-00953-1).

Eaglesham, A.R.J.; Ellis, J.M.; Evans, W.R.; Fleidchman, D.E.; Hungaria, M. y Hardy, R.W.F. (1990) The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium*: characteristic, pp 805-811. En P. M. Greshoff, L. E. Roth, G. Stayce, y W. L. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman and Hall, Ltd., London.

Earl, C.D.; Ronson, C.W. y Ausubel, F.M. (1987) Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 1127-1136.

Egli, M.A.; Griffith, S.M.; Miller, S.S.; Anderson, M.P. y Vance, C.P. (1989) Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* **93**: 898-904.

Egli, M.A.; Griffith, S.M.; Miller, S.S.; Anderson, M.P. y Vance, C.P. (1989) Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* **93**: 898-904.

Eisbrenner, G. y Evans, H.J. (1983) Spectral evidence for a component involved in hydrogen metabolism of soybean nodule bacteroids. *Plant Physiol* **70**: 1667-1672.

Elkan, G.H. (1992) Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **38**: 446-450.

Emerich, D.W.; Lepo, J.E., y Evans, H.J. (1983) Nodule metabolism. En: *Nitrogen Fixation 3: Legumes*. W.J. Broughton (ed.). Oxford University Press, New York.

Emmerich, D.W.; Ruiz-Argüeso, T.; Ching, T.M. y Evans, H.J. (1979) Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* **137**: 153-160.

Evans, H.J.; Purohit, K.; Cantrell, M.A.; Eisbrenner, G.; Russell, S.A.; Hanus, F.J. y Lepo, J.E. (1981) Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. En: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. A.H. Gibson y W.E. Newton (eds.), pp. 84-96. Australian Academy of Science. Camberra.

Evans, H.J.; Purohit, K.; Cantrell, M.A.; Eisbrenner, G.; Russell, S.A.; Hanus, F.J. y Lepo, J.E. (1981) Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. En: Current Perspectives in Nitrogen Fixation. A.H. Gibson y W.E. Newton (eds.), pp. 84-96. Australian Academy of Sciences, Canberra.

Evans, D.; Jones, R.; Woodley, P. y Robson, R. (1988) Further analysis of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Azotobacter chroococum*: identification and expression in *Klebsiella pneumoniae* of *nifS*, *nifV*, *nifM* and *nifB* genes and localization of *nifE/N*, *nifU*, *nifA* and *fixABC*-like genes. J. Gen. Microbiol. 134: 931-942.

Faria, S.M.; Hay, G.T. y Sprent J.I. (1988) Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benthham occurs between epidermal cells. J. Gen. Microbiol. 134: 2291-2296.

Fauque, G.; Peck, H.D., Jr.; Moura, J.J.G.; Huynh, B.H.; Berlier, Y.; der-Vartanian, D.V.; Texeira, M.; Przybyla, A.E.; Lespinat, A.T.; Moura, I. y LeGall, J. (1988) The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfobivrio*. FEMS Microbiol. Rev. 54: 299-344.

Fernández-Quintela A., Macarulla M.T. y Martínez J.A. (1993) Obtención y caracterización de concentrados de proteína a partir de leguminosas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos 33(3):285-297.

Finan, T.M.; Oresnik, I. y Bottacin, A. (1988) Mutants of *R. meliloti* defective in succinate metabolism. J. Bacteriol. 170: 3396-3403.

Finan, T.M.; Hirsch, A.M.; Leigh, J.A.; Johansen, E.; Kuldau, G.A.; Deegan, S.; Walker, G.C. y Signer, E.R. (1985) Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40: 869.

Finan, T.M.; Hirsch, A.M.; Leigh, J.A.; Johansen, E.; Kuldau, G.A.; Deegan, S.; Walker, G.C. y Signer, E.R. (1985) Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell. 40: 869.

Fischer, H.M. y Hennecke, H. (1987) Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen. Genet. 209: 621-626.

Fougère, F.; LeRudulier, D. y Streeter, J.G. (1991) Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiol. 96: 1228-1236.

Franssen, H.J.; Nap, J.P. y Bisseling, T. (1992) Nodulins in root nodule development. En: Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 598-624. Chapman and Hall, New York.

Gallon, J.R. y Chaplin, A.E. (1987) Nitrogen Fixation in Perspective. En: An Introduction to Nitrogen Fixation. J.R. Gallon y A.E. Chaplin (eds.), pp. 1-10. Cassell, Londres.

Gates, P.J. y Boulter, D. (1979b) Nitrogen regime and isoenzyme changes in *Vicia faba*. *Phytochem.* 18:1789-1791.

Gates, P.J. y Boulter, D. (1979a) The use of isoenzymes as an aid to the breeding of field beans (*Vicia faba*). *Fabis* 1: 18.

Gleen, A.R.; McKay, I.A.; Arwas, R. y Dilworth, M. J. (1984) Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Bacteriol.* 130: 239-245.

Goodchild D.J. y Bergersen, F.J. (1966) Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol* 92: 204-213.

Hagberg, A. y Sjodin, J. (1975) Broad bean. En: *Food Protein Sources*. Pirie N.W. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 117-119.

Hanelt, P. (1972) Die infraspezifische Variabilität von *Vicia faba* L. und ihre Gliederung. *Kult'pflanz.* 20: 75-128.

Hanway, J.J. y Weber, C.R. (1971a) Dry matter accumulation in eight soybean [*Glycine max* (L) Merrill] varieties. *Agron. J.* 63: 227-230.

Harker, A.R.; Xu, L.S.; Hanus, F.J. y Evans, H.J. (1984) Some properties of the nickel-containing hydrogenase of chemolithotrophically grown *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 159: 850-856.

Hidalgo, E.; Palacios, J.M.; Murillo, J. y Ruíz-Argüeso, T. (1992) Nucleotide sequence and characterization of four additional genes of the hydrogenase structural operon from *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. *J. Bacteriol.* 174: 4130-4139.

Hong, Z.Q. y Copeland, L. (1990) Pentose phosphate pathway enzymes in nitrogen-fixing leguminous root nodules. *Phytochem.* 29: 2437-2440.

Hunt, S.; Gaito, S.T. y Layzell, D.B. (1988) Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characterisation of the diffusion barrier and estimation of the concentrations of CO₂, H₂ and N₂ in the infected cells. *Planta* 173: 128-141.

Hutchinson, J. (1964) *The genera of flowering plants. Dicotyledones, 1.* 516 pp. Clarendon Press, Oxford.

Hyman, M.R. y Arp, D.J. (1987) Acetylene is an active-site-directed, slow-binding, reversible inhibitor of *Azotobacter vinelandii* hydrogenase. *Biochem.* 26: 6447-6454.

Imperial, J.; Vinod K.S.; Hoover, T.R. y Ludden P.W. (1988) Characterization of components involved in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. En: *Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation*. Colonia, Alemania. H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton (eds), p. 128. Gsusyav Fisher, Stuttgart.

Jiao, J.-A. y Chollet, R. (1989) Regulatory seryl-phosphorylation of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase by a soluble protein kinase from maize leaves. *Arch Biochem Biophys* 269: 526-535.

Jiao, J.-A. y Chollet, R. (1991) Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C4 and Crassulacean acid metabolisms plants. *Plant Physiol.* 95: 981-985.

Kanayama, Y.; Watanabe, I. y Yamamoto, Y. (1990) Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. 1. Nitrite accumulation and formation of nitrosylhemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol.* 31: 341-346.

Kay, D.E. (1979) Legumbres alimenticias. Editorial Acibia. S.A. 437 pp.

King, B.J.; Layzell, D.B. y Canvin, D.T. (1986) The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. *Plant Physiol.* 81: 200-205.

Koch, K.E.; Nolte, K.D.; Duke, E.R.; McCarty, D.R. y Avigne, W.T. (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4: 59-69.

Kohl, D.H.; Lin, J.-J.; Shearer, G. y Schubert, K.R. (1990) Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in legume root nodules. *Plant Physiol.* 94: 1258-1264.

Kohl D.H.; Schubert K.R.; Carter M.B.; Hagedron C.H. y Shearer, G. (1988) Proline metabolism in nitrogen-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2036-2040.

Kurtz, W.G.W. y LaRue, T.A. (1977) Citric acid cycle enzymes and nitrogenase in nodules of *Pisum sativum*. *Can. J. Microbiol.* 23: 1197-1200.

Ladha, J.K.; Pareek, R.P.; So, R.B. y Becker, M. (1990) Stem nodule symbiosis and its unusual properties, p. 633-640. En P. M. Greshshoff, L. E. Roth, G. Stacey y W. L. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman and Hall, Ltd., London.

Lafontaine, P.J.; Lafranière, C.; Chalifour, F.P.; Dion, P. y Antoun, H. (1989) Carbohydrate and organic acid composition of effective and ineffective root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 76: 507-513.

Laing, W.A.; Christeller, J.T. y Sutton, W.D. (1979) Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. *Plant Physiol.* 63: 450-454.

Lambert, G.R.; Harker, A.R.; Cantrell, M.A.; Hanus, F.J.; Russel, S.A.; Haugland, R.A. y Evans, H.J. (1987) Symbiotic expression of cosmid-borne *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 422-428.

Lance, C. y Rustin, P. (1984) The central role of malate in plant metabolism. *Physiol. Veg.* 22: 526-641.

LaRue, T.A.; Peterson, J.B. y Tajima, S. (1984) Carbon metabolism in legume nodules. En *Advances in Nitrogen Fixation Research*, C. Veeger, W. E. Newton, pp 437-443.

Leyva, A.; Palacios, J.M.; Murillo, J. y Ruiz, Argüeso, T. (1990) Genetic organization of the fixation uptake (hup) cluster from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 172: 1647-1655.

Li, B. y Chollet, R. (1994) Salt induction and the partial purification/characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase from an inducible Crassulacean-acid-metabolism (CAM) plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Arch. Biochem. Biophys.* 314: 247-254.

Ligero, F.; Caba J.M.; Lluch, C. y Olivares J. (1991) Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* 97, en prensa.

Lorenzo, C.; Fernández-Pascual M.M. y De Felipe M.R. (1994) Protective enzymes against active oxygen species during nitrate-induced senescence of *Lupinus Albus* nodules. *J. Plant Physiol.* 144: 633-640.

Loukas, M.; Stavrakakis, C.B. y Krimbas, C.B. (1983) Inheritance of polymorphic isoenzymes in grape cultivars. *J. Hered.* 74: 181-183.

Martín, L.M. y Gutiérrez, J.C. (1983) La producción de semillas de leguminosas en grano en España. En: *Leguminosas de Grano*. J.I. Cubero y M.T. Moreno (eds.), pp. 341-355. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.

Martínez, E.; Segovia, L. y Mercante, T.M. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.

Martínez-Molina, E. y Olivares, J. (1982) A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 453-455.

Maxwell, C.A.; Vance, C.P.; Heichel, G.H. y Stade, S. (1984) CO₂ fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and partitioning of ¹⁴C to the plant. *Crop Sci.* 24: 257-264.

McDermot, T.R.; Griffith, S.M.; Vance, C.P. y Graham, P.H. (1989) C₄-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3481. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1433-1440.

McParland, R.H.; Guevara, J.G.; Becker, R.R. y Evans, H.J. (1976) The purification of the glutamine synthetase from the cytosol of soybean root nodules. *Biochem. J.* **153**: 597-606.

Millerd, A. (1975) Biochemistry of legume seed proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **25**: 53-72.

Minchin, F.R.; Becana, M. y Sprent, J.I. (1989) Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate: II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta* **180**: 46-52.

Moreno, M.T.; Martin, A. y Cubero, J.I. (1984) Inheritance of some characters affecting the flower colour in *Vicia faba*. *Fabis* **3**: 28.

Morrell, M. y Copeland, L. (1984) Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules. Alkaline invertase. *Plant Physiol.* **74**: 1030-1034.

Morrell, M. y Copeland, L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* **78**: 149-154.

Murotava, V. (1931) Common beans (*Vicia faba* L.). *Suppl. of Bull. Appl. Bot. Genet. and Pl. Breed.* (suppl. 50th).

Nap, J.P. y Bisseling, T. (1990b) The roots of nodulins. *Physiol. Plant.* **79**: 407-414.

Nap, J.P. y Bisseling, T. (1990a) Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. En: *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. P.M. Gresshoff (ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp: 182-216.

Nap, J.P. y Bisseling, T. (1989) Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. En: *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. P.M. Gresshoff (ed.), pp. 181-229. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Nelson, L.M. y Salminen, S.O. (1982) Uptake hydrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *J. Bacteriol.* **151**: 989-995.

O'Brian, M.R. y Maier, R.J. (1985) Role of ubiquinone in hydrogen dependent electron transport in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **161**: 775-777.

O'Brian, M.R. y Maier, R.J. (1988) Hydrogen metabolism in *Rhizobium*: Energetics, regulation, enzymology and genetics. *Adv. Microb. Physiol.* **29**: 1-52.

O'Brian, M.R. y Maier, R.J. (1989) Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbioses. *Biochim. Biophys. Acta*: **974**, 229-246.

O'Hara, G.; Boonkerd, N. y Dilworth, M.J. (1988) *Plant and Soil* **108**: 93-110.

Ou Yang, L.-J.; Udvardi, M.K. y Day, D.A. (1990) Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta* **182**: 437-444.

Palacios, J.M.; Leyva, A. y Ruíz-Argüeso, T. (1988) Generation and characterization of hydrogenase deficient mutants in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Plant Physiol.* **132**: 412-416.

Pate, J.S. (1980) Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 313.

Pate, J.S. y Layzell, D.B. (1990) Energetics and Biological Cost of Nitrogen assimilation. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol. **16**, pp. 1-41. P.J. Stumpf. y E.E. Conn (eds.). Academic Press. New York.

Patterson, C.G. y La Rue, T.A. (1983) Nitrogen fixation and ureide content of soybeans: enviromental effects and source sink manipulations. *Crop. Sci.* **23**: 819-824.

Peterson, J.B. y Evans, H.J., (1978) Properties of pyruvate kinase from soybean nodule cytosol, *Plant Physiol.* **61**: 909-914.

Peterson, J.B. y Evans, H.J. (1979) Phosphoenol-piruvate carboxilase fromo soybean nodule cytosol. Evidence for izoenzymes and kinetics of the most active component. *Biochem. Biophys. Acta*, **567**: 445-452.

Pladys, D.; Barthe, P. y Rigaud, J. (1988) Changes in intracellular pH in French-bean nodules induced by senescence and nitrate treatment. *Plant Sci.* **56**: 99-106.

Podesta, F.E., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1990) Oligomeric enzymes in the C4 pathway of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **26**: 161-170.

Postgate, J. (1987) Nitrogen Fixation. J. Postgate (ed.). Edward Arnold.

Pueppke, S.G. (1986) Physiology of nodule initiation in the nitrogen-fixing legume-*Rhizobium* symbiosis. *Physiol. Plant.* **67**: 262-266.

Rawsthorne, S. y LaRue, T.A. (1985) Respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria from nodules of cowpea. En: *Nitrogen Fixation Research Progress*, H.J. Evans, P.J. Bottomley y W.E. Newton (eds.) Martinus Nijhoff, Dordrecht, 351.

Rey, L.; Murillo, J.; Hernando, Y.; Hidalgo, E.; Imperial, J. y Ruíz Argüeso, T. (1993). Molecular analysis of a microaerobically induced operon required for hydrogenase synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv viciae. *Mol. Microbiol.* **8**: 471-481.

Rey, L.; Imperial, J.; Palacios, J.M. y Ruíz Argüeso, T. (1994) Purification of *Rhizobium leguminosarum* a nickel-binding protein required for hydrogenase synthesis. J. Bacteriol. 176: 6066-6073.

Rhosendahl, L.; Glenn, A.R. y Dilworth, M.J. (1991). En Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. Eds. Dilworth M. J. and Glenn A. R. pp 259-292. Elsevier. Amsterdam-NewYork-Oxford-Tokyo.

Robertson, J.G.; Lyttleton, P.; Bullivant, S. y Grayston, G.F. (1978) Membranes in lupin root nodules. 1. The role of golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. J. Cell Sci. 30: 129-149.

Robertson, J.G. y Farden, K.J.F. (1984) Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. En: The biochemistry of plants, vol 12, pp. 65-113, Davies, D.D., ed. Academic Press, New York.

Robson, R.L.; Eady, R.R.; Richardson, T.H.; Miller, R.W.; Hawkins, M. y Postgate, J.R. (1986) The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. Nature 322: 388-390.

Rosendahl, L.; Vance, C.P. y Pedersen, B. (1990) Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. Plant Physiol. 93: 12-19.

Ruiz-Argüeso, T.; Hidalgo, E.; Murillo, J.; Rey, L. y Palacios, J.M. (1991) Molecular genetics of the hydrogen uptake system of *Rhizobium leguminosarum*. En: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds). pp. 182-188. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Ruiz-Argüeso, T.; Emerich, D.W. y Evans, H.J. (1979) Hydrogenase system in legume nodules: A mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. Biochem. Biophys. Res. Commun. 86: 259-264.

Salminen, S.O. y Streeter, J.G. (1987) Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. J. Bacteriol. 169: 495-499.

San Francisco, M.J.D. y Jacobson, G.R. (1985) Uptake of succinate and malate in cultured cells and bacteroids of two slow-growing species of *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 131: 765-773.

Sayavedra-Soto, L.A.; Powell, G.K.; Evans, H.J. y Morris, R.O. (1988) Nucleotide sequence of the genetic loci encoding subunits of *Bradyrhizobium japonicum* uptake hydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8395-8399.

Schubert, K.R. y Evans, H.J. (1976) Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1207-1211.

- Schubert, K.R. (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 539-574.
- Schuller, K.A.; Turpin, D.H. y Plaxton, W.C. (1990) Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **94**: 1429-1435.
- Seefeldt, L.C. y Arp, D.J. (1989a) Cyanide inactivation of hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**: 3298-3303.
- Seefeldt, L.C. y Arp, D.J. (1989b) Oxygen effects on the nickel- and iron-containing hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem.* **28**: 1588-1596.
- Sellstedt, A.; Högberg, P. y Jonsson, K. (1989) Diurnal variation in acetylene reduction and net hydrogen evolution in five tropical and subtropical nitrogen-fixing tree symbioses. *J. Exp. Bot.* **40**: 1163-1168.
- Sequeira, L. (1986) Plant-bacterial interactions. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 17*, 187-211. A. Pirson y M.H. Zimmermann (eds.). Springer-Verlag, Berlín.
- Serraj, R.; Drevon, J.J.; Obaton, M. y Vidal, A. (1992) Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) - *Bradyrhizobium* symbiosis. *J. Plant Physiol.* **140**: 366-371.
- Simpson, F.B. y Burris, R.H. (1984) A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Sci.* **224**: 1095-1097.
- Sprent, J.I.; Giannakis, C. y Wallace, W. (1987) Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. *J. Exp. Bot.* **38**: 1121-1128.
- Sprent, J.I.; Sutherland, J.M. y Faria, S.M. (1989) Structure and function of root nodules from woody legumes. En: *Advances in Legume Biology, Vol. 29*. C.H. Stirton y J.L. Zarucchi (eds.), pp. 559-578. *Monog. Syst. Bot., Missouri Bot. Gard., Missouri*.
- Sprent, J.I. (1987) *The Ecology of the Nitrogen Cycle*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 151 pp.
- Stam, H.; van Verseveld, H.W.; De Vries, W. y Stouthamer, A. (1984) Hydrogen oxidation and efficiency of nitrogen fixation in succinate-limited chemostat cultures of *Rhizobium* ORS 571. *Arch. Microbiol.* **139**: 53-60.
- Streeter J.G. (1982) Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.* **69**: 1429-1434.
- Streeter J.G. (1985b) Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. II. Short term studies with high nitrate supply. *Plant Physiol.* **88**: 325-328.

Streeter, J.G. (1987) Effect of nitrate on the organic acid and amino acid composition of legume nodules. *Plant Physiol.* **85**: 774-779.

Streeter J.G. (1985a) Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiol.* **77**: 321-324.

Suganuma, N. y Yamamoto, Y. (1987) Carbon metabolism related to nitrogen fixation in soybean root nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.* **33**: 79-91.

Suso M.J., Moreno M.T. y Cubero J.I. (1986) Inheritance of leaf characters in *Vicia faba* II. Primitive cultivars. *Genet. Agr.* **40**:47-56.

Tajima, S.; Kimura, I. y Sasahara, H. (1986) Succinate metabolism of isolated soybean nodule bacteroids at low oxygen concentration. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1009-1014.

Thorneley, R.N.F. y Lowe, D.J. (1985) Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system. En: *Molibdenum Enzymes*. T.G. Spiro (ed.), pp. 222-284. J. Wiley and Sons, New York.

Thummler, F. y Verma, D.P.S. (1987) Nodulin 100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free haem in nodules *J. Biol. Chem.* **262**: 14730.

Torck M. y Pinkas M. (1992) Les flavonoides du genre *Vicia*. *Biochem. Syst. Ecol.* **20(5)**:453-457.

Touraine, B.; Grignon, N. y Grignon, C. (1988) Charge balance in NO₃-fed soybeans. *Plant Physiol.* **88**: 605.

Truchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promé, J.-C. y Deénarié, J. (1991) Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.

Udvardi, M.K.; Ou Yang, L.-J.; Young, S. y Day, D.A. (1990) Sugar and amino acids transport across symbiotic membranes from soybean nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 334-340.

Udvardi, M.K.; Price, G.D.; Gresshoff, P.M. y Day, D.A. (1988). A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Letters* **231**: 36-40.

Udvardi, M.K. y Day, D.A. (1989). Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. *Plant Physiol.* **90**: 982-987.

Vance, C.P. y Stade, S., (1984) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenol pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **75**: 261-264.

Vance, C.P.; Boylan, K.L.; Maxwell, C.A.; Heichel, G.H. y Hardman, L.L. (1985) Transport and partitioning of CO₂ fixed by root nodules of ureide and amide producing legumes. *Plant. Physiol.* **78**: 774-778.

Vance, C.P. y Heichel, G.H. (1991) Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 373-392.

Verma, D.P.S.; Fortin, M.G.; Stanley, J.; Mauro, V.P.; Purohit, S. y Morrison, N. (1986) Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Mol. Biol.* **7**: 51-61.

Vicent, J.M. (1980). En: A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. *Internacional Biological Programme Handbook 15*. Blackwell, Oxford.

Waters, J.K.; Karr, D.B. y Emerich, D.W. (1985) malate deshidrogenase from *Rhizobium japonicum* 311b-143 bacteroides and *Glicine max* root-nodule mitochondria. *Biochemistry* **24**: 6479-6486.

Werner, D.; Mörschel, E.; Stripf, R. y Winchenbach, B. (1980) Development of nodules of *Glycine max* infected with an infective strain of *Rhizobium japonicum*. *Planta* **147**: 320-329.

Werner, D. y Krotzky, A. (1983) Die symbiontische Stickstoff-Fixierung der Leguminosen, *Funkt. Biol. Med.* **3**: 31.

Werner, D.; Dittrich, W. y Thierfelder, H. (1982) Malonate and Krebs cycle intermediates utilization in the presence of other carbon sources by *Rhizobium japonicum* and soybean bacteroids. *Z. Naturforsch.* **37c**: 921.

Witty, J.F.; Minchin, F.R.; Skot, L. y Sheehy, J.E. (1986) Nitrogen fixation and oxigen in legume root nodules. *Plant Mol. Ccell Biol.* **3**: 275-314.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

Wu, M.X. y Wedding, R.T. (1992) Inactivation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxilase by the binding to chloroplast membranes. *Plant Physiol.* **100**: 382-387.

Yeh, G.C. y Phang, J.M. (1988) Stimulation of phosphoribosyl pyrophosphate and purine nucleotide production by pyroline-5'-carboxylate in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **263**: 13083-13089.

Young, J.P.W. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, H.J. Evans y R.H. Burris (eds.), pp. 43-86. Chapman and Hall, New York.

Zaat, S.A.J.; van Brussel, A.A.N.; Tak, T.; Lugtenberg, B.J.J. y Kijne, J.W. (1989)
The ethylene-inhibitor aminoethoxyvinylglycine restores normal nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* on *Vicia sativa* subsp. *nigra* by suppressing the thick and short roots phenotype. *Planta* 177: 141-150.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053199