

12/18

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE
NITROGENO Y AZUFRE COMO FERTILIZANTE,
SOBRE LA FISIOLOGIA DE LA SIMBIOSIS
RHIZOBIUM MELILOTI - *MEDICAGO SATIVA* L

FRANCISCO LIGERO LIGERO

Tesis Doctoral

VOL. I



Biblioteca Universitaria de Granada



01611513

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1984

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA

Estante 43

Tabla 1

Núm. 1611

R. 29.405

T
11
111
1

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE NITROGENO Y AZUFRE
COMO FERTILIZANTE SOBRE LA FISIOLOGIA DE LA SIMBIOSIS
Rhizobium meliloti - *Medicago sativa* L.

Estudio del efecto de la aplicación de nitrógeno y azufre
como fertilizante, sobre la fisiología de la simbiosis
Rhizobium meliloti - *Medicago sativa* L

FRANCISCO LIGERO LIGERO

Tesis Doctoral

VOL. I

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1984

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>619595625</u>
Nº Copia <u>121175822</u>

1984

FACULTAD DE CIENCIAS



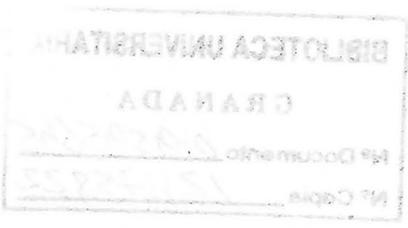
Estudio del efecto de la aplicación de nitrógeno y azufre
como fertilizante, sobre la fisiología de la simbiosis
Rhizobium meliloti - Medicago sativa I.

FRANCISCO LIGERO LIGERO

Tesis Doctoral

VOL. I

Depósito legal: Gr. 225/1984



UNIVERSIDAD DE GRANADA
1984

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACION DE NITROGENO Y AZUFRE
COMO FERTILIZANTE SOBRE LA FISIOLOGIA DE LA SIMBIOSIS

Rhizobium meliloti - Medicago sativa L.

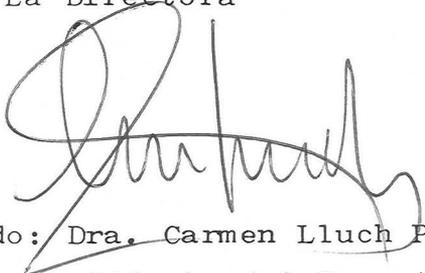
Memoria que presenta el Ldo.
en Ciencias (Sección Biológicas)
D. Francisco Ligeró Ligeró, para
aspirar al Grado de Doctor.



Fdo: Francisco Ligeró Ligeró

Vº Bº

La Directora



Fdo: Dra. Carmen Lluch Pla
Prof. Adjunto del Departamento
Interfacultativo de Fisiología
Vegetal.

Granada, Mayo de 1984

Al Sr. D. Luis Recalde Manrique, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la inestimable ayuda prestada al realizar el estudio estadístico de los resultados.

A la Sra. Lili por la paciencia y buen agrado con que en todo momento acogió el desagradable trabajo de mecanografía, de parte de esta memoria, tarea de árdua dificultad. Igual

Tesis doctoral dirigida por la Profesora Doctora D^a. Carmen Lluch Plá, Profesora Titular del Departamento Interfacultativo de Fisiología Vegetal. Fue leída el día 29 de Junio de 1984, ante el tribunal formado por los profesores: Sánchez Díaz, Pamplona; Olivares Pascual, Granada; Gómez-Moreno Calera, Zaragoza; Recalde Manrique, Granada; Lluch Plá, Granada. Obteniendo la calificación de Sobresaliente "Cum Laude".

ra sido mucho mejor provechoso, con especial mención a Juan Caspón.

Por último, quiero hacer extensivo el agradecimiento a los Departamentos de Microbiología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de Granada, así como a su personal, que me permitieron utilizar sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis doctoral con especial agradecimiento.

A todos ellos, gracias.



Al Dr. D. Luis Recalde Manrique, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la inestimable ayuda prestada al realizar el estudio estadístico de los resultados.

A la Srta. Lili por la paciencia y buen agrado con que en todo momento acogió el desagradable trabajo de mecanografía, de parte de esta memoria, tarea de árdua dificultad. Igualmente a la Srta. Adelina por su decisiva contribución en el trabajo de mecanografía.

En fin, a todos mis compañeros de Departamento por el constante apoyo y camaradería, mostrada hacia mi durante todos estos años. Sin los que, sin duda, este periodo de tiempo hubiera sido mucho menos provechoso, con especial mención a Juan Campos.

Por último, quiero hacer extensivo mi agradecimiento a los Departamentos de Microbiología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de Granada, así como a su personal, que muy amablemente me han permitido utilizar algunas de sus instalaciones cuando fue necesario.

A todos ellos, gracias.

Al finalizar la memoria que presento, me veo obligado a expresar mi más sincera gratitud a cuantas personas, de una forma u de otra, han hecho posible la realización de este trabajo. Convencido de que sin su apoyo hubiera sido menos fructífero,

Al Prof. Dr. D. Luis Recalde Martínez , Catedrático de Fisiología Vegetal y Director - del Departamento Interfacultativo de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada, por haberme acogido en el Departamento que dirige y haber puesto a mi disposición las instalaciones de dicho Departamento donde se ha realizado este trabajo.

A la Profesora Dra. D^a Carmen Lluch Plá Profesor Titular de Fisiología Vegetal, Directora de esta Tesis, que en ningún momento ha escatimado dedicación y entusiasmo y que me ha enseñado que con el esfuerzo y voluntad constante se pueden superar las dificultades de cada momento, haciendo más agradable el trabajo diario, inculcándome al mismo tiempo seriedad y rigor en el trabajo científico.

Al Dr. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del C.S.I.C. de la U. E. de Microbiología de la Estación Experimental - del Zaidín, quien en todo momento me ofreció sus valiosos conocimientos y consejos, sin los cuales hubiera sido mucho más difícil la realización de este trabajo. Igualmente, por la ayuda técnica prestada. También a todo el personal de la citada sección donde siempre fui bien recibido.

A Soledad mi mujer
A Mari Sol mi hija,
por las horas que este
trabajo les ha robado.

INDICE

	<u>Pág.</u>
I. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO	3
II. PLAN DE TRABAJO	4
III. INTRODUCCION	13
1.- Las Leguminosas	13
2.- Clasificación de las Leguminosas	13
1.2.- Descripción Botánica	15
1.3.- Importancia Práctica de las Leguminosas	16
3.- Simbiosis <u>Micorrizas</u> - Leguminosas	19
3.1.- Aspectos Generales del <u>M. Mycorrhizae</u>	20
3.2.- Características de las Micorrizas	21
3.2.1.- Asociación <u>Micorrizas</u> - Leguminosa	21
3.2.2.- Descripción y Ultraestructura de las Micorrizas	25
3.2.3.- Infección de las Raíces por <u>M. Mycorrhizae</u>	25
3.2.4.- Iniciación e Infección del <u>Micorrizas</u> Familiar	27
3.2.5.- Desarrollo del Tallo y Raíces	27
3.3.- Significado de la fijación de Nitrógeno en las Raíces de Leguminosas	28
3.4.- Desarrollo de las Micorrizas	29
3.5.- Asociación <u>M. Mycorrhizae</u> - Leguminosa	30
3.6.- Transporte de nutrientes	31

A mis padres

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
I. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO	3
II. PLAN DE TRABAJO	9
III. INTRODUCCION	13
1.- Las Leguminosas	13
1.1.- Clasificación de las Leguminosas ..	13
1.2.- Descripción Botánica	15
1.3.- Interés Práctico de las Leguminosas.	18
2.- Simbiosis <u>Rhizobium</u> - Leguminosa	19
2.1.- Aspectos Generales del G. <u>Rhizobium</u>	20
2.2.- Características Simbióticas de la Asociación <u>Rhizobium</u> - Leguminosa..	24
2.3.- Desarrollo y Ultraestructura de los Nódulos	25
2.3.1.- Infección de la Raíz por <u>Rhi</u> <u>zobium</u>	25
2.3.2.- Iniciación e Infección del Meristemo Nodular	40
2.3.3.- Desarrollo del Tejido Nodular	41
2.4.- Bioquímica de la Fijación de Nitróge no en los Nódulos de Leguminosas...	44
2.4.1.- Estudio de la Nitrogenasa...	44
2.4.2.- Asimilación del Amónio	50
2.4.3.- Transporte de Asimilados <u>Ni</u> trogenados.....	54
2.5.- Aspectos Fisiológicos de la Fijación de Nitrógeno	57
2.5.1.- Protección de la Nitrogenasa Contra el Daño Causado por el Oxígeno	57

	<u>Pág.</u>
2.5.2.- Leghemoglobina : Localiza ción y Función	58
2.5.3.- Metabolismo del Hidrógeno : Sistemas Hidrogenasa	62
2.5.4.- Interrelación entre Fotosín tesis y Fijación de Nitróge no	66
2.6.- Hormonas en la Fijación de Nitrógeno	68
3.- Nutrición Mineral de las Leguminosas	75
3.1.- Composición Mineral de las Legumino- sas.	76
3.2.- Efecto de la Nutrición Mineral sobre la Calidad de las Leguminosas	82
3.3.- Nutrición Nitrogenada	83
3.3.1.- Absorción	84
3.3.2.- Transporte y Acumulación de Nitrógeno	85
3.3.3.- Metabolismo del Nitrato	89
3.3.4.- Deficiencias de Nitrógeno en Plantas	102
3.3.5.- Exceso de Nitrógeno en Plan - tas	104
3.3.6.- Toxicidad del Amonio	105
3.3.7.- Nitrógeno como Fertilizante..	108
3.4.- Nutrición Azufrada	124
3.4.1.- Absorción y Acumulación de Azufre	124
3.4.2.- Transporte	126
3.4.3.- Metabolismo del Azufre	127
3.4.4.- Deficiencias de Azufre	132
3.4.5.- Toxicidad del Azufre	134
3.4.6.- El Azufre como Fertilizante..	134

	<u>Pág.</u>
3.5.- Relación Nitrógeno - Azufre	137
IV MATERIAL Y METODOS	143
1.- Material Biológico	145
2.- Esquema de los Tratamientos	147
3.- Soluciones Nutritivas	148
4.- Condiciones Ambientales	152
5.- Experimentos Realizados	153
5.1.- Experimentos en Cultivos Hidropóni- cos en Tubo de Ensayo	153
5.1.1.- Esterilización y Germinación de las Semillas	153
5.1.2.- Preparación de los Inóculos	154
5.1.3.- Preparación de los Tubos de Cultivo	154
5.1.4.- Diseño Experimental	155
5.1.5.- Determinaciones Realizadas..	157
5.2.- Experimentos en Cultivos Hidropóni- cos con Soporte Inerte en Macetas..	158
5.2.1.- Preparación de las Macetas..	158
5.2.2.- Mantenimiento del Cultivo	159
5.2.3.- Diseño Experimental	160
5.2.4.- Recogida de Muestras y Deter- minaciones Realizadas.....	160
6.- Metodología Utilizada	162
6.1.- Liberación de Etileno por las Rai- ces de Alfalfa	162
6.2.- Actividad Nitrogenasa Específica...	163
6.3.- Determinación de la Actividad Nitra- to Reductasa.....	165
6.4.- Determinación de Azúcares en dife- rentes Organos Vegetales	167
6.5.- Determinación de Clorofila.....	172

	<u>Pág.</u>
6.6.- Determinación de Leghemoglobina en los Nódulos	172
6.7.- Determinaciones Analíticas en las Plantas	173
6.7.1.- Mineralización de la Muestra	174
6.7.2.- Determinación de Nitrógeno.	174
6.7.3.- Determinación de Fósforo...	175
6.7.4.- Determinación de Potasio...	176
6.7.5.- Determinación de Calcio y Magnesio	177
6.7.6.- Determinación de Azufre....	178
6.7.7.- Determinación de Azufre en forma de Sulfato	179
6.7.8.- Determinación de Nitratos..	179
7.- Elaboración de los Datos y Estudio Estadístico Realizado	181
V RESULTADOS Y DISCUSION	185
1.- Experimentos en Cultivos Hidropónicos con Tubos de Ensayo	187
1.1.- Experimentos Tipo A	187
1.2.- Experimentos Tipo B y C	209
2.- Experimentos en Cultivos Hidropónicos con Soporte Inerte	231
2.1.- Experimentos Tipo A	231
2.1.1.- Análisis del Crecimiento...	231
2.1.2.- Nodulación y Fijación de Nitrógeno	237
2.1.3.- Determinaciones Bioquímicas	241
2.1.4.- Análisis Químico de la Planta	253

	<u>Pág.</u>
2.2.- Experimentos Tipo B	271
2.2.1.- Análisis del Crecimiento ...	271
2.2.2.- Nodulación y Fijación de Ni- trógeno	278
2.2.3.- Determinaciones Bioquímicas.	281
2.2.4.- Análisis Químico de la Planta	288
2.3.- Experimento Tipo C	305
2.3.1.- Análisis de Crecimiento	305
2.3.2.- Nodulación y Fijación de Nitrógeno	312
2.3.3.- Determinaciones Bioquímicas.	317
2.3.4.- Análisis Químico de la Planta	325
VI. CONCLUSIONES	337
VII. BIBLIOGRAFIA	343

OBJETO DEL TRABAJO

La investigación se propone estudiar el comportamiento de los microorganismos y sus actividades metabólicas y fisiológicas en las plantas de la familia Fabaceae, especialmente en las especies de la subfamilia Papilionaceae, para determinar el grado de adaptación de estas plantas a las condiciones ambientales y su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico. Por otro lado, se pretende estudiar el papel de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la nutrición de las plantas de esta familia, así como la influencia de los factores ambientales en la fijación de nitrógeno por parte de las bacterias y en la absorción de nitrógeno por las plantas. Se pretende también estudiar el papel de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la nutrición de las plantas de esta familia, así como la influencia de los factores ambientales en la fijación de nitrógeno por parte de las bacterias y en la absorción de nitrógeno por las plantas.

I. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

El objeto del presente trabajo es estudiar el comportamiento de los microorganismos y sus actividades metabólicas y fisiológicas en las plantas de la familia Fabaceae, especialmente en las especies de la subfamilia Papilionaceae, para determinar el grado de adaptación de estas plantas a las condiciones ambientales y su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico. Por otro lado, se pretende estudiar el papel de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la nutrición de las plantas de esta familia, así como la influencia de los factores ambientales en la fijación de nitrógeno por parte de las bacterias y en la absorción de nitrógeno por las plantas. Se pretende también estudiar el papel de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la nutrición de las plantas de esta familia, así como la influencia de los factores ambientales en la fijación de nitrógeno por parte de las bacterias y en la absorción de nitrógeno por las plantas.

El interés del presente trabajo radica en el estudio de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las bacterias y su influencia en la nutrición de las plantas de la familia Fabaceae, especialmente en las especies de la subfamilia Papilionaceae. Este estudio es de gran importancia para comprender el papel de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la nutrición de las plantas y para determinar el grado de adaptación de estas plantas a las condiciones ambientales.

OBJETO DEL TRABAJO

La investigación que se propone es un amplio estudio sobre diversos aspectos fisiológicos y bioquímicos de la simbiosis Rhizobium-leguminosa. La planta hospedadora aporta el fotosintato que la bacteria utiliza para obtener el poder energético y reductor, necesario para la reducción del nitrógeno atmosférico. Por otro lado, la bacteria excreta hacia la planta la mayor parte del amonio procedente de la fijación. Es por tanto necesaria, una coordinación perfecta entre leguminosa y bacteria para que la simbiosis sea eficaz.

Los cultivos de leguminosas de gran transcendencia por su riqueza protéica, en la alimentación animal y humana presentan altos requerimientos en nitrógeno, clave para la obtención de un incremento sustancial en la rentabilidad de sus cosechas. Sin embargo, la fertilización nitrogenada con lleva un elevado coste energético y económico que determina que en muchas ocasiones, el cultivo agrícola no sea rentable. Desgraciadamente, el problema se agrava cuando se observa que en el campo, el fertilizante nitrogenado se pierde fácilmente por lixiviación y desnitrificación, además de las implicaciones ecológicas por la posible contaminación de las aguas potables. Es obvio que la solución pasa por la búsqueda de una fuente alternativa de nitrógeno más barata y menos perjudicial. Esta fuente, puede estar en la capacidad que tienen estas plantas para utilizar el nitrógeno atmosférico, cuando se encuentran asociados en simbiosis con las bacterias del género Rhizobium.

Así como la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados convencionales, resulta en la mayoría de las plantas cultivadas, en un incremento paralelo en los rendimientos de las cosechas, siempre que exista el oportuno equilibrio entre los otros elementos minerales, la ex-

perencia muestra que las leguminosas no responden de la forma general. Estas plantas prefieren la utilización del nitrógeno fijado biológicamente en simbiosis con Rhizobium, proceso limitado y en clara competencia con la absorción y asimilación de los fertilizantes nitrogenados de cualquier naturaleza.

Además de la interferencia que puede tener la fertilización nitrogenada, en la fijación biológica de nitrógeno puede intervenir otro elemento nutritivo: el azufre. Durante años, nuestro equipo de trabajo, ha venido investigando la influencia de este elemento, en el proceso de fijación de nitrógeno y en la productividad de los cultivos de diversas leguminosas. La nutrición azufrada influye en el proceso de nodulación de las raíces de leguminosas infectadas por Rhizobium y en el metabolismo nitrogenado, aunque los conocimientos de esta interacción son limitados.

La simbiosis Rhizobium-leguminosa es hoy día objeto de numerosos estudios debido a la gran variedad de facetas, aún desconocidas de su biología. Ello ha animado a investigar los requerimientos de una nutrición mineral correcta de la planta para que tenga lugar una óptima fijación de nitrógeno.

Por ello, el trabajo está dirigido a cumplir dos objetivos principalmente :

1.- El estudio de aspectos fisiológicos de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, durante la implantación del nódulo, para lo cual se utilizarán cultivos hidropónicos en tubos de ensayo.

2.- La optimización de los requerimientos nutricionales de las leguminosas en nitrógeno y azufre, estudiando su influencia en la fisiología de la planta y en el rendimiento del cultivo.

La planta elegida ha sido la alfalfa (Medicago sativa) que por un lado, presenta un gran interés en nutrición

animal en esta región agrícola, y por otro, a la abundancia de conocimientos que sobre su Rhizobium específico, R. meliloti, se han derivado de los estudios desarrollados en la U.E. de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.). Investigaciones que han permitido conocer muchos aspectos de su bioquímica y genética, los cuales pueden ser una base de conocimientos de gran utilidad. También hay que tener en cuenta que es una planta de fácil adaptabilidad a condiciones de crecimiento controlado.

La investigación se plantea a nivel de investigación básica con experimentos de laboratorio y en cámaras de cultivo con ambientes controlados. Sin duda alguna, potenciar la fijación biológica de nitrógeno en estos cultivos y un adecuado conocimiento de las condiciones óptimas de fertilización de forma que actúe perfectamente coordinada con la inoculación bacteriana, será en un futuro inmediato clave para obtener importantes rendimientos en las cosechas.

II. PLAN DE TRABAJO

II. PLAN DE TRABAJO

PLAN DE TRABAJO

De acuerdo con los objetivos generales expuestos anteriormente se estableció el siguiente plan de trabajo.

A) Efectuar una exhaustiva revisión bibliográfica de las materias que inciden en el tema de investigación que nos ocupa.

B) Ensayos "in vitro" con cultivos axénicos en tubos de ensayo, para estudiar :

- Influencia del nitrógeno y el azufre conjunta e individualmente, como fertilizantes, en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno.

- Influencia del etileno endógeno liberado por las raíces de plantas inoculadas en la implantación y desarrollo del nódulo.

- La determinación del perfil de la fijación de nitrógeno (actividad nitrogenasa específica) en la simbiosis, R. meliloti - M. sativa.

C) Ensayos con cultivos hidropónicos utilizando como soporte material inerte (arena - perlita), conducentes a investigar las posibles interacciones entre Rhizobium y el fertilizante (nitrógeno y/o azufre) en el desarrollo de la planta.

El estudio de la interacción entre Rhizobium y la fertilización azufrada y nitrogenada se ha desglosado en 3 tipos de experimentos, en los cuales se separan los distintos tipos de interacción.

- Inoculación bacteriana y distintas relaciones N/S en el medio radical.

- Inoculación bacteriana y diferentes niveles de azufre manteniendo el nivel de nitrógeno del medio constante.

- Inoculación bacteriana y diferentes niveles de nitrógeno, manteniendo el nivel de azufre en el medio radical constante.

Estas interacciones se estudiarán desde el punto de vista de su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta y nódulos, sobre determinados procesos metabólicos y sobre el equilibrio nutricional de la planta.

Se tratará por tanto de estudios que incluyen aspectos de investigación básica que contribuirán al conocimiento de la fisiología de la simbiosis Rhizobium - leguminosa y otros aspectos encaminados a economizar la fertilización nitrogenada necesaria para este tipo de cultivo.

INTRODUCCION

Las leguminosas, que son las plantas que forman parte de la familia de las Leguminosae, son de gran importancia económica por su valor alimenticio y como abonos verdes. Estas plantas son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en sus raíces, lo que las convierte en una fuente importante de nitrógeno para el suelo. Además, sus semillas son ricas en proteínas y se utilizan como alimento para el ganado y como fuente de harina para la alimentación humana.

En los últimos años se ha observado un aumento en el consumo de leguminosas, especialmente de soja y garbanos, debido a su alto contenido en proteínas y fibra. Esto ha llevado a un mayor interés en el cultivo de estas plantas y en el desarrollo de variedades mejoradas. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar el cultivo de leguminosas en condiciones de campo, evaluando el rendimiento y la calidad de las semillas obtenidas. Para ello se han establecido parcelas experimentales con diferentes variedades y se han aplicado diferentes tratamientos de fertilización y riego. Los resultados obtenidos se discutirán en el capítulo correspondiente.

III. INTRODUCCION

El presente trabajo se divide en tres partes: una introducción, un desarrollo y una conclusión. En la introducción se expone el objeto del estudio y se justifican los motivos que han llevado a realizarlo. En el desarrollo se describen los métodos utilizados y se presentan los resultados obtenidos. Finalmente, en la conclusión se resume lo más importante de lo que se ha estudiado y se dan algunas sugerencias para futuras investigaciones.



1.- LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas junto con los cereales, han sido la base esencial de la alimentación humana durante milenios, siendo su utilización en sus múltiples formas compañera inseparable de la evolución del hombre. Sin duda, pueden ser consideradas en la actualidad como cultivos de gran trascendencia económica.

En los últimos 20 años los avances realizados encaminados a potenciar la producción mundial de los cereales, han sido espectaculares, su rendimiento se ha duplicado, a pesar de haber aumentado sólo un 10 % su superficie de siembra. La utilización de mejores variedades, la aplicación de fertilizantes, el control de plagas, irrigación, etc. han sido las causas de los buenos resultados de la llamada revolución verde. Tal incremento supone unos costos económicos que sólo pueden ser mantenidos en países desarrollados que obtienen así 2.5 veces el rendimiento conseguido en países más pobres.

Sin embargo, la producción mundial de leguminosas, no ha tenido unos incrementos en sus cosechas tan considerables. A pesar de la importancia nutritiva de estas especies vegetales, parece que se les considera cultivos de segunda clase, donde no ha habido avances tecnológicos y agrícolas que puedan ser comparables a los obtenidos para otros cultivos.

1.1- Clasificación de las Leguminosas.

Las leguminosas se agrupan botánicamente en la familia Leguminosae, extraordinariamente rica en especies, sólo superada en las angiospermas por las familias Compositae y Orchidaceae. La enorme variabilidad de formas y estrategias adoptadas ha permitido a sus especies adaptarse a las condiciones ecológicas más diversas, que van desde los trópicos a zonas templadas e incluso frías.

Se dividen en tres subfamilias: Papilionoideae, que comprende 10.000 especies vegetales, la mayoría de ellas conocidas en nuestras latitudes (Hutchinson, 1973), Mimosoideae, con 1.500 especies botánicas y Cesalpinoideae, con 1.300 especies, estas dos últimas están representadas principalmente por árboles o arbustos tropicales en un 95 y 97% respectivamente (Allen y Allen, 1976).

Una característica de interés de esta familia botánica es su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico en asociación con bacterias del género Rhizobium. Hellriegel y Wilfarth (1888), desvelaron que los lugares activos de la utilización del nitrógeno atmosférico son los nódulos que se forman en las raíces de la leguminosa, infectadas por la bacteria.

La nodulación con Rhizobium está bastante extendida dentro de esta familia. A pesar de que el número de generos y especies estudiadas, con respecto al total, es relativamente bajo (Postgate, 1978), se puede afirmar que la nodulación es un fenómeno común en las subfamilias Mimosoideae y Papilionoideae, con una incidencia superior al 95% y más raro en Cesalpinoideae, con algo más del 23% de especies noduladas, (Allen y Allen, 1961 ; Sprent, 1979).

El único caso bien documentado de formación de nódulos por Rhizobium en no-leguminosas se presenta con especies del G.Parasponia de la familia Ulmaceae (Becking, 1977; Akkermans et al., 1978). Esta práctica limitación de la formación de nódulos por Rhizobium a la familia Leguminosae contrasta con las actinorrizas, otra simbiosis microbio-planta fijadora también de nitrógeno, donde los actinomicetos implicados forman nódulos con diferentes angiospermas no relacionadas botánicamente (Becking, 1974).

Es interesante hacer constar que no hay datos de asociaciones que forman nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico con monocotiledoneas (Becking, 1977).

Las leguminosas mejor estudiadas son las que se encuentran en zonas templadas. En estas latitudes se pueden desarrollar especies aptas para grano como guisante, haba, soja, entre otras, y especies forrajeras como la alfalfa y el trébol (Sprent, 1979). Aunque la agricultura moderna ha conducido a esta especialización, en zonas no muy desarrolladas la dualidad de utilización todavía persiste. Actualmente no se utilizan como forrajeras las lentejas y judías, estando en decadencia el uso de habas y guisantes para el mismo fin. Sin embargo la almorta, el altramuza y la veza aún presentan la doble posibilidad, incluso la misma variedad es utilizada unas veces para grano y otras para forraje, aunque en nuestro país se empieza a reservar unas para un uso y otras para otro, como ocurre con la veza, que es, junto con el altramuza, el caso más claro de doble uso (Cubero y Moreno, 1983).

1.2.- Descripción Botánica.

Son plantas con flores papilionadas cuya corola tiene cinco pétalos y es zigomorfa, cáliz concrescente y con cinco sépalos. Normalmente las flores se disponen en racimos. Las hojas alternas, son generalmente pinnadas que han derivado a otras formas, trifoliadas (alfalfa, judía), paripinnada (cacahuete) o incluso se han reducido a un zarcillo o un foliolo. El fruto es típicamente en legumbre, monocarpelar, polispermo, cuya dehiscencia es por la sutura ventral y nervio medio simultáneamente. Las semillas son exoalbuminosas, con dos cotiledones adosados que dejan entre ambos la plántula. La raíz pivotante puede alcanzar grandes profundidades, dependiendo del tipo de suelo y del nivel de agua del mismo. Hay especies perennes que pueden formar rizomas en determinados hábitats. Los tallos son erectos o rastreros, el primero de ellos se origina entre los cotiledones, los siguientes de las axilas de las hojas inferiores y con el tiempo se pueden volver leñosos (Bolton, 1962).

1.3.- Interés Práctico de las Leguminosas,

Las leguminosas se consideran cultivos encaminados a ocupar un papel importante en la alimentación humana, según los informes de la FAO (FAO, 1964 ; 1975). Las semillas presentan un alto contenido en hidratos de carbono, representados entre un 35% en altramuz y un 67% en guisantes, siendo el principal constituyente el almidón (Beroard - Cerning y Filiatre, 1977). El contenido de lípidos es en general bajo, oscila entre 2 y 4%, siendo en garbanzo algo superior (6%). Excepciones notables son el cacahuete (43%), la soja (18%) y algunas especies del género Lupinus (15%), lo que ha motivado su estudio como posibles plantas oleaginosas. También son ricas en vitaminas hidrosolubles como la riboflavina (B₂), tiamina (B₁), ácido fólico, ácido pantoténico, ácido ascórbico (C) y niacina; y liposolubles como el tocoferol y la provitamina A (Bressani y Elias, 1974). Los minerales que aportan las leguminosas a la dieta animal y humana son interesantes, entre ellos tenemos el calcio, mucho más abundante en leguminosas que en cereales, su aportación es del orden de 100 mg cada 100 g (Zorita et al., 1972) y el hierro, cuya media es de 7 mg por cada 100 g.

El elevado contenido proteico en el grano de algunas especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para la mayor parte de herbívoros y omnívoros (Cubero y Moreno, 1983). Según la clasificación que da Osborne (1924) de las proteínas, las leguminosas contienen una gran proporción de albúminas y globulinas. Son fracciones proteicas de almacenamiento o reserva sintetizadas durante la formación de la semilla para utilizarlas en la germinación. Los estudios realizados por Danielsson (1949) y Millerd (1975), entre otros, indican la posibilidad de aumentar la cantidad y calidad de las proteínas de las leguminosas modificando las proporciones de las proteínas de almacenamiento. El porcentaje medio de proteína en semilla madura se sitúa, en general, entre el 20 y 25%

aunque hay especies que sobrepasan este límite, el altramuza sin seleccionar llega al 30% normalmente, la soja puede llegar al 44% tras un proceso de selección de variedad. Esto obliga a pensar que la potencialidad de este grupo es grande por lo que sería interesante someter a las leguminosas a un proceso de mejora continuada como el de los cereales. La calidad de la proteína depende del contenido en aminoácidos esenciales. En general las leguminosas son deficientes en metionina y cisteína pero no en lisina que es limitante en cereales (Cubero y Moreno, 1983).

Otra cualidad de las leguminosas, descrita por historiadores antiguos y puesta de manifiesto por Boussingault (1838) en sus estudios sobre fertilización y nutrición vegetal fue detectar el enriquecimiento en nitrógeno del suelo, después de un cultivo de leguminosas. Generalmente estas plantas prefieren terrenos calcáreos y secos pero se adaptan muy bien a suelos ácidos, aunque se aconseja el encalado en terrenos ácidos donde al elevarse el pH se favorece la nodulación por Rhizobium (Hallsworth, 1958).

La capacidad de las leguminosas de establecer simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno, permite la colonización de suelos que de otro modo permanecerían casi despoblados. El abandono del cultivo de leguminosas puede tener consecuencias graves aunque no sean visibles a corto plazo, una ausencia prolongada de estos cultivos, provoca en el suelo un empobrecimiento en bacterias fijadoras de nitrógeno, que contribuye a la desertización del mismo (Cubero y Moreno, 1983). Esta característica beneficia no sólo a las leguminosas que la poseen, sino a las gramíneas y otras familias que crecen a su lado. Esta asociación es esencial en prados naturales y artificiales sobre los que se basa la ganadería mundial.

Con el aumento del precio de los fertilizantes y la crisis energética, los agrónomos señalan que es interesante utilizar las leguminosas anuales o perennes como fuente de

abonado nitrogenado mediante el entierro en verde o a través de los clásicos sistemas rotacionales de cultivo. Las leguminosas forrajeras presentan además la ventaja de, al poder ser levantado el cultivo en primavera, dar un margen para el barbecho, antes de la sementera del otoño siguiente. Una parte del nitrógeno fijado por las leguminosas queda en el suelo y puede ser utilizado por los cultivos siguientes (Villax, 1963), generalmente cereales.

El monocultivo trae consigo una disminución de los rendimientos, se favorece la proliferación de malas hierbas con un desarrollo análogo al cultivo en cuestión y la proliferación de plagas, enfermedades y autotoxinas que limitan el crecimiento. Con la alternancia de cultivos se controla la vegetación espontánea y permite el aprovechamiento mejor de la fertilidad que ofrece el suelo (Pozo, 1977).

Un tercer aspecto interesante de las leguminosas es su aprovechamiento como forraje y pienso. Las semillas de leguminosas constituyen el complemento más utilizado para aumentar el contenido en proteínas en las raciones concentradas que se suelen administrar a monogástricos: aves, cerdos y conejos (Cubero y Moreno, 1983). Entre las leguminosas grano utilizadas como piensos se encuentran el altramuza, veza, almorta, algarroba, haba y soja, siendo esta última la que ha eliminado a las otras prácticamente del mercado de materias primas para piensos, incluso de vacuno y ovino (Bolton, 1962).

Las leguminosas forrajeras se utilizan directamente por los animales mediante el pastoreo o bien pueden ser cosechadas y almacenadas para su posterior utilización. Este almacenamiento ha de estar precedido por la desecación (henificación natural) o por una deshidratación (henificación forzada). Otra forma correcta de conservación es la acidificación (ensilado), que es el aprovechamiento más usual en explotaciones ganaderas (Pozo, 1977).

Un forraje muy versátil, en cuanto a su utilización se refiere, es la alfalfa. Se puede utilizar como pastoreo, heno y ensilado, con un amplio margen de flexibilidad para acomodar su producción forrajera a las necesidades del rebaño y a las condiciones climatológicas. Este forraje es indicado para rumiantes (vacuno y ovino) y para el ganado equino sin embargo no deja de ser interesante para la alimentación de monogástricos. Con objeto de asegurar la buena productividad del cultivo, es importante tener en cuenta la época del corte o segado y el número de cortes. El corte se debe realizar cuando la planta tenga el máximo de reservas, esto ocurre en el estadio de plena floración, en este momento el producto obtenido es rico en proteínas, vitaminas y pobre en fibra (Nielsen y Lysgaard, 1956).

2.- SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

El nitrógeno junto con el agua es el factor limitante más común para las plantas a pesar de tratarse de uno de los elementos mayoritarios que constituyen los seres vivos y del principal componente de la atmósfera. Este elemento, como tal, es inerte y solamente utilizable por las plantas y animales en forma fijada, mineral para las primeras y orgánica para los segundos. La fijación biológica de nitrógeno, tiene un gran significado en la ecología de nuestro planeta (Döbbereiner et al., 1978) y su potenciación aminoraría no sólo el gasto que representa la fertilización nitrogenada, con productos sintetizados a expensas de combustibles fósiles, sino también los problemas de contaminación que su abuso lleva consigo (Bedmar y Olivares, 1982).

Hay que tener en cuenta que del total anual de nitrógeno atmosférico fijado (210×10^6 toneladas, según las últimas apreciaciones) aproximadamente 120×10^6 toneladas, corresponden al fijado biológicamente. El resto se debe a la

fijación química que puede ser; natural, la que se produce a través de descargas eléctricas, ozonización o combustión (30 millones de toneladas) o artificial, siguiendo el proceso de Haber-Boch, (60 millones de toneladas) en el cual el nitrógeno se transforma en amoníaco que será incorporado a los fertilizantes, en un proceso que requiere presión y temperatura elevada dependiente del petróleo y gas natural , (Olivares et al., 1979).

La fijación biológica es un proceso que , aunque muy extendido, aparece sólo en microorganismos procarióticos libres o en asociación más o menos estricta con plantas. De todas las formas posibles, la de mayor significación agrícola es la fijación llevada a cabo por la simbiosis mutualista Rhizobium-leguminosa ya que estas plantas son, por su riqueza en nitrógeno, como hemos visto, una fuente insustituible de proteínas para la alimentación humana y animal (González de Aguilar et al., 1983).

2.1.- Aspectos Generales del G. Rhizobium

Los microorganismos del Género Rhizobium son bacterias aerobias Gram negativas, bien adaptadas a la supervivencia en el suelo y ampliamente extendidas. Pudiéndose aceptar que allá donde se encuentre una leguminosa susceptible de ser infectada se encuentra su Rhizobium específico, lo contrario, si embargo, es más difícil de asegurar (Vincent, 1979).

Clasificación del Género Rhizobium

La forma de clasificar las especies de este género bacteriano ha sido muy controvertida. Clásicamente se dividen en 6 especies, de acuerdo con unos débiles criterios taxonómicos entre los cuales se incluyen la leguminosa que más específicamente infectan. Esta clasificación se recoge en la tabla nº 1.

Tabla 1.- Clasificación de las bacterias del G. Rhizobium.

<u>Bacteria</u>	<u>Velocidad de crecimiento</u>	<u>Huesped</u>	<u>Grupo</u>
R. <u>trifolii</u>	Rápida	<u>Trifolium</u>	Trébol
R. <u>leguminosarum</u>	"	<u>Pisum, Lens,</u> <u>Lathyrus, Vicia</u>	Guisante
R. <u>phaseoli</u>	"	<u>Phaseolus</u>	Judía
R. <u>meliloti</u>	"	<u>Melilotus,</u> <u>Medicago,</u> <u>Trigonella</u>	Alfalfa
R. <u>lupini</u>	Lento	<u>Lupinus, Orni-</u> <u>thyrus</u>	Altramuz
R. <u>japonicum</u>	Lento	<u>Glycine max</u>	Soja
R. <u>cowpea</u>	Variable	<u>Vigna, Arachis,</u> etc.	Cowpea

Sin embargo, hay autores que no consideran válido este criterio de clasificación y proponen agruparlos según su velocidad de crecimiento, resultando así dos grupos o especies: uno de crecimiento rápido (tiempo medio de generación 3 - 4 horas) y otro de crecimiento lento (tiempo medio de generación de 6 - 8 horas). Dentro de estas dos especies existirían variedades adaptadas a los distintos grupos de leguminosas. Actualmente, se admite la existencia de un tercer grupo de microorganismos, grupo "cowpea", adaptados a distintas especies de leguminosas, en el que se incluyen bacterias de velocidad de crecimiento variable, generalmente de especificidad poco estricta y que principalmente infectan a leguminosas tropicales (Vincent, 1977).

Mediante la aplicación de las técnicas serológicas (Vincent, 1977) se han encontrado relaciones entre los distintos tipos de Rhizobium que no se detectan si se tiene en con

sideración sólo el proceso de infección y que pueden permitir una nueva clasificación del G. Rhizobium (Vincent, 1979; Napoli et al., 1979).

Fijación de nitrógeno por Rhizobium en vida libre.

Durante mucho tiempo se consideró dogma la necesidad del Rhizobium de establecer simbiosis con la leguminosa específica, para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Este dogma empezó a ser cuestionado en la década de los setenta y es en 1975, cuando algunos investigadores observaron que cuando las estirpes bacterianas del G. Rhizobium se cultivan en condiciones de microaerofilia (Kurz y LaRue, 1975; McComb et al., 1975; Pagan et al., 1975) pueden fijar nitrógeno atmosférico, en vida libre. La mayor proporción de nitrógeno fijado es excretada como amoníaco (Bergersen y Turner, 1978).

Los informes positivos de la fijación de nitrógeno por Rhizobium en vida libre estuvieron restringidos a especies de R. japonicum y a las del grupo cowpea, todas ellas de lento crecimiento (Bergersen y Gibson, 1978). Sin embargo recientemente se puso de manifiesto este tipo de fijación en R. meliloti, bacteria de rápido crecimiento (Bednary y Olivares, 1979). También se ha observado que tanto las razas de crecimiento rápido, como las de crecimiento lento, pueden fijar nitrógeno cuando crecen en presencia de cultivos de células vegetales o en medios líquidos con cantidades variables de ("plant-cell-conditioned medium") medio procedente de cultivos de células vegetales (Bednarski y Reporter, 1978). Todos estos hechos, demuestran que Rhizobium contiene la dotación genética necesaria para la fijación, interviniendo la planta en el sentido de crear las condiciones que permitan su expresión.

Consideraciones genéticas del G. Rhizobium

Los estudios realizados con mutantes de razas de R. japonicum, procedentes de inóculos comerciales (Maier y Brill, 1978), sugirieron que estas razas podrían ser mejoradas, al menos en algunos aspectos. Sería de considerable valor producir razas de Rhizobium que no pierdan efectividad, durante el almacenamiento en medio artificial (Schwinghamer 1977).

Aunque la selección de mutantes de gran efectividad es un enfoque útil para la producción de nuevas razas, el objetivo global de la investigación en esta área debe ser la producción de mapas genéticos de las especies del G. Rhizobium y determinar qué genes son esenciales para la simbiosis. Entonces será posible estudiar si es factible o no la manipulación de Rhizobium en orden de adaptar un organismo a una planta y ambiente particular con objeto de maximizar la productividad de las cosechas (Brill, 1978; Prakash et al., 1979).

El estudio de los métodos de transferencia de genes por transformación y traducción ha sido descrito en diferentes especies de Rhizobium (Schwinghamer, 1977). Estas técnicas, normalmente, implican la transferencia de pequeños fragmentos de DNA y son, por tanto, más adecuadas para emplearlas en posteriores estadios de la localización génica sobre el cromosoma. Por el contrario, la conjugación implica la transferencia de grandes fragmentos de DNA y es útil, en los primeros estadios del mapa genético (Beringer, 1976a). Utilizando esta técnica se han construido mapas circulares de ligamiento para el R. meliloti raza 201 (Meade y Signer, 1977), R. meliloti raza 41 (Kondorosi et al., 1977 a) y R. leguminosarum raza 300 (Beringer et al., 1978), entre otras, todas ellas, razas efectivas de crecimiento rápido (Casadesus y Olivares, 1978).

Se han presentado evidencias que sugieren que algunos genes del Rhizobium, asociados con la simbiosis, se encuentran en grandes plásmidos (Prakash et al., 1979). Esta observación fortalece la hipótesis de que la inestabilidad, en la efectividad de algunas razas puede ser debida a la pérdida de un plásmido (Beringer, 1976 b; Schwinghamer, 1977). Hoy día está totalmente demostrado que la información necesaria para la expresión de las características simbióticas es extracromosómica. Se encuentran en plásmidos de diferente peso molecular, algunos extremadamente grandes (más de 700 Mdal) por lo menos en Rhizobium de rápido crecimiento (Rosenberg, et al., 1981).

2.2.- Características Simbióticas de la Asociación Rhizobium-leguminosa.

La simbiosis Rhizobium-leguminosa, se establece como resultado de la expresión de unas características propias de la bacteria (Denaire y Truchet, 1974; Schwinghamer, 1977) de la planta huésped (Nutman, 1952; Holl y LaRue, 1976) y de la asociación de ambas (Dixon, 1969; Vincent, 1974). Estas características o propiedades simbióticas reciben el nombre de :

a) Especificidad, por la que la bacteria infecta selectivamente su planta específica. Cualquiera que sea el mecanismo de invasión de las raíces por Rhizobium, se sabe que existe un grado de especificidad variable. En efecto, ciertas leguminosas tienen unos requisitos muy concretos para "su" Rhizobium, mientras que otras aceptan un espectro más amplio (Broughton, 1978).

b) Infectividad, capacidad que tienen las bacterias para infectar al tejido radical de la planta huésped y formar nódulos. El único modelo global que explica esta propiedad, es el modelo de Nutman (1965), no obstante, trabajos posteriores que lo habían aceptado como hipótesis de trabajo

han proporcionado resultados contradictorios. Un análisis de la validez del modelo de Nutman, se encuentra en la revisión de Olivares (1977).

c) Efectividad o actividad, tercera propiedad o "característica simbiótica" de la asociación Rhizobium-leguminosa. Como consecuencia de su correcta expresión tiene lugar en el nódulo la secuencia de procesos, que conducen a la reducción del nitrógeno atmosférico a amoníaco.

Hasta llegar a la fijación de nitrógeno van a sucederse una serie de pasos intermediarios que con su fenotipo correspondiente se exponen en la tabla nº 2.

2.3.- Desarrollo y Ultraestructura de los Nódulos.

2.3.1.- Infección de la Raíz por Rhizobium.

Uno de los primeros eventos que ocurren en el proceso de la infección, entre el Rhizobium en vida libre y la raíz de la leguminosa hospedadora, además de la estimulación del crecimiento de la bacteria en la rizosfera y de la elongación y ramificación de los pelos radicales, es la unión de la bacteria a la superficie de dichos pelos (Dazzo, 1979). Este proceso de unión, Bauer (1981) lo denomina reconocimiento.

Reconocimiento.

Al estudiar el mecanismo de reconocimiento en la interacción planta-microorganismo, Albersheim y Anderson-Prouty (1975) sugirieron que los determinantes moleculares podían ser las lectinas en la planta huésped y un componente carbohidrato de la superficie celular microbiana. La idea de que las lectinas de la planta huésped están involucradas en el reconocimiento del microorganismo simbiótico ha sido revisada por diversos autores (Albersheim y Anderson-Prouty 1975; Bauer y Bhuvaneshwary, 1979).

Tabla n° 2.- Etapas en el establecimiento de una simbiosis Rhizobium-leguminosa eficiente y fenotipos correspondientes.

<u>Descripción</u>		<u>Fenotipo</u>
- Multiplicación de <u>Rhizobium</u> cerca de la raíz.	(<u>R</u> oot <u>c</u> olonization)	Roc
- Reconocimiento de la raíz	(<u>R</u> oot <u>r</u> ecognition)	Ror
- Unión de la bacteria a la célula radical	(<u>R</u> oot <u>a</u> dhesion)	Roa
- Ramificación de los pelos radicales	(<u>H</u> air <u>b</u> ranching)	Hab
- Curvatura de los pelos	(<u>H</u> air <u>c</u> urling)	Hac
- Formación del filamento de infección	(<u>I</u> nfection)	Inf
- Desarrollo del meristemo	(<u>N</u> odule <u>i</u> nitiation)	Noi
- Salida de las bacterias del filamento	(<u>B</u> acterial <u>r</u> elease)	Bar
- Desarrollo de las bacteroides	(<u>B</u> acteroid <u>d</u> evelopment)	Bad
- Síntesis de la leghemoglobina		Lhb
- Reducción del $N_2 \longrightarrow NH_3$	(<u>N</u> itrogen <u>f</u> ixation)	Fix
- Activación de la hidrogenasa	(<u>H</u> idrogen <u>u</u> ptake)	Hup
- Funciones bioquímicas y fisiológicas complementarias	(<u>C</u> omplementary <u>f</u> unctions)	Cof
- Persistencia de la función nodular	(<u>N</u> odule <u>p</u> ersistence <u>f</u> unctions)	Npf

Bohlool y Schmidt (1974) proporcionaron la primera evidencia experimental de una correlación entre la unión de las lectinas de la planta huésped a la superficie celular bacteriana y la capacidad de tales microorganismos para infectar la planta. En el trabajo original Bohlool y Schmidt, (1974) observaron que las lectinas de las semillas de soja, marcadas con fluoresceína, se unían específicamente a la superficie celular de 22 cultivos de razas de R. japonicum de los 25 ensayados. La correlación entre unión de las lectinas y la infectividad fue mejorada cuando las bacterias fueron cultivadas con la raíz huésped o con exudados radicales de éstas (Bhuvaneswari y Bauer, 1978).

Si efectivamente las lectinas son mediadoras en el proceso de unión de Rhizobium a la raíz, ejerciendo como agentes de enlaces entre las estructuras antigénicas presentes en la raíz y en la bacteria, es un tema que se está debatiendo actualmente (Kamberger, 1979). Sin embargo, las correlaciones existentes entre la unión a las lectinas y la infectividad del Rhizobium, son difíciles de seguir explicando - las únicamente como simples coincidencias (Dazzo et al., 1978)

En las revisiones de Schmidt (1979) y de Broughton (1978) se estudia la naturaleza, características, propiedades y funcionamiento de las lectinas. En ellas se defiende la hipótesis de que las lectinas, situadas en determinados "sitios" del pelo radical, interaccionan específicamente con lipopolisacaridos concretos situados en la superficie del Rhizobium apropiado. Estos receptores parecen estar presentes en la superficie de la bacteria, sólo en determinados momentos del cultivo (Dazzo et al., 1979).

Las lectinas de naturaleza glucoproteínica, son tetrámeros con subunidades que pueden ser idénticas (Tipo I), iguales dos a dos (Tipo II) o incluso todas diferentes (Tipo III) (Broughton, 1978), y pueden poseer 0, 1, 2 ó 4 sitios de unión para los rizobios por tetrámero.

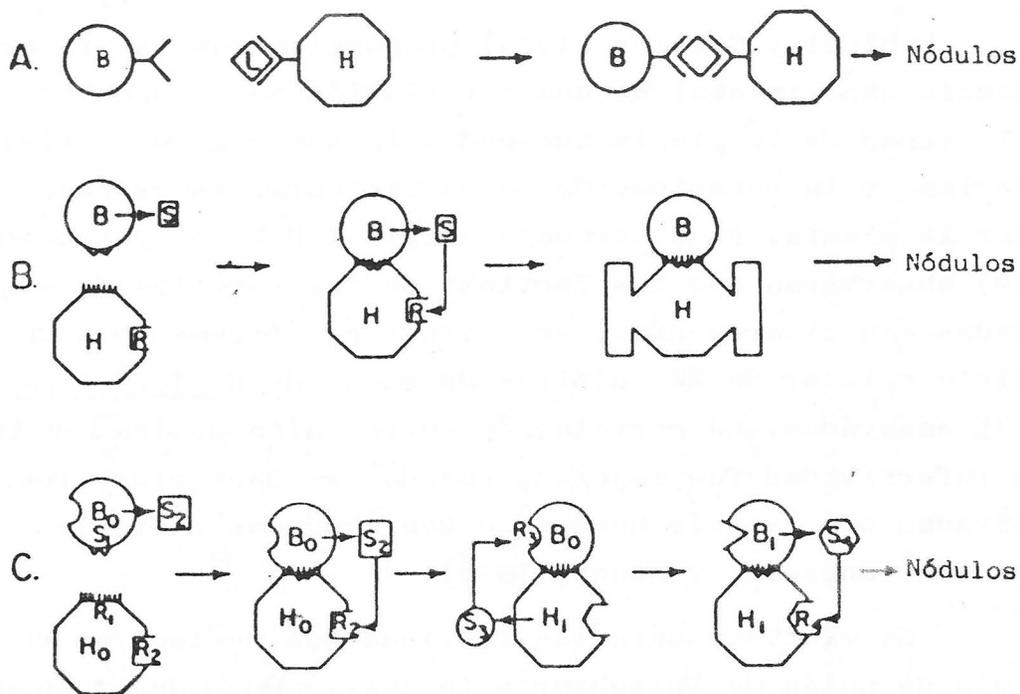


Figura 1.- Modelos de reconocimiento propuestos para las asociaciones Rhizobium-leguminosa. (B); bacteria; (H): huesped; (L) lectina; (R): receptor; (S): señal.

Los mecanismos (figura 1) por los cuales los polisacáridos de la superficie celular y las lectinas pueden estar implicados en el reconocimiento, propuestos en la bibliografía consultada, han sido diversos :

a) Dazzo y Hubbell (1975) proponen un modelo simple que implica la unión de la lectina del trébol a un "sitio antígeno" común sobre la superficie de ámbos, raíz y bacteria simbiote. Una vez se adhiera la lectina a la bacteria simbiote tiene lugar la infección y nodulación. Este modelo falló al no indicar alguna diferencia "funcional", en términos de infección y nodulación, entre la unión mediada por las lectinas del trébol y la unión no mediada por las lectinas.

b) Un modelo alternativo propuesto por Graham (1980) refleja el enfoque primitivo de Albersheim y Anderson Prouty (1975) y de Bauer y Bhuvaneshwari (1979). En este modelo, la bacteria se une a una célula huésped adecuada por un mecanismo no específico. En esta unión, una sustancia extracelular o componente superficial del microorganismo interactúa con una sustancia receptora de la superficie de la célula huésped. Esta interacción dispara ciertas respuestas en el huésped que conducen a la infección y nodulación. Como en el modelo anterior tenemos que: el "receptor" puede ser las lectinas de la planta; la "señal" puede ser el polisacárido de la bacteria y la interacción entre la "señal" y el "receptor" puede contribuir a la unión física del microorganismo al huésped, aumentando con ello la probabilidad de la subsiguiente infección y nodulación. El énfasis de este nuevo modelo está en "la activación por el microorganismo de las respuestas del huésped".

c) Se ha propuesto un tercer modelo de reconocimiento. Este modelo sugiere que el reconocimiento no es un proceso que conste de un solo paso, sino que es el resultado acumulativo de una serie de interacciones señal-respuesta. El paso inicial se describe como un ataque de la bacteria a la célula "target" de la planta. Después de esta unión el modelo consiste en una secuencia alterada de: producción de señales, recepción y respuestas inducidas por la recepción de las señales entre los simbioses.

En este modelo de reconocimiento, formado por una serie de pasos individuales señal-respuesta, se podría estudiar y caracterizar individualmente, la producción de señales, la recepción de las distintas señales y las distintas respuestas acopladas a la recepción. Todo ello, contribuiría a explicar la especificidad biológica de la simbiosis. Por tanto no hay que desestimar una interacción señal-respuesta que por sí sola no puede explicar la especificidad de la simbiosis.

d) También es interesante mencionar el trabajo de Bowles (1979), encaminado a dilucidar cómo la capacidad de enlace de las lectinas superficiales puede estar regulada y acoplada a actividades internas de la célula huésped. Su hipótesis sugiere que las lectinas superficiales, localizadas en las membranas, pueden unirse a receptores endógenos de las membranas. De acuerdo con esta hipótesis, la formación, mantenimiento y destrucción de estos complejos, puede regular la actividad de las lectinas y modular cualquier actividad bioquímica. La interacción de la lectina con los componentes externos (carbohidratos), puede afectar la formación de complejos de lectinas con los componentes endógenos de la membrana y viceversa. Este modelo es útil porque no se restringe únicamente a los componentes externos de la membrana celular y va más allá de cualquier referencia a las lectinas. Sin lugar a duda, la dificultad está en aislar, purificar y caracterizar a los receptores endógenos (Bauer, 1981).

A pesar de esta evidencia de la implicación de las lectinas hay también bastantes en contra: infección de las plantas que no forman lectinas (Pull et al., 1978), razas de R. meliloti que aunque incapaces de unirse a las lectinas de la alfalfa forman nódulos (Paau et al., 1981), etc. Los recientes trabajos de Stacey y Brill (1982) hacen la teoría actualmente controvertida.

La unión de Rhizobium mediada por lectinas no es exclusiva. Es importante tener en mente que son microorganismos muy prósperos en el suelo y es posible su ligazón a cualquier superficie, que represente una fuente de nutrientes. También se ha observado un ligamiento polar de las células de Rhizobium a varias superficies de distinta naturaleza (vidrio, plástico, etc.,) (Dazzo, 1979; Stacey et al., 1980). Parece probable que la unión polar esté mediada por cuerpos polares (Tsien y Schmidt, 1977). Sin embargo, se desconoce la naturaleza bioquímica de los "cuerpos polares" así como, las condiciones ambientales que gobiernan la formación y pérdida de estos "cuerpos polares".

Localización de las células radicales susceptibles de infección.

Utilizando técnicas inmunológicas, bioquímicas y electrofisiológicas, se ha podido comprobar en mutantes de Rhizobium (Long et al., 1981) de crecimiento rápido que la inmensa mayoría de las bacterias unidas a la raíz nunca llegan a infectar y en general, sólo el 5% de las infecciones producen nódulos, siendo el resto abortados. Teniendo en cuenta que las células individuales de los pelos radicales o epidérmicas, pueden tener cada una varios rizobios ligados, quizás hasta 20 ó 30, los pares celulares huésped/bacteria que producen la infección con éxito son una fracción mínima, alrededor del 1%. (Dazzo et al., 1976).

Los nódulos no se forman en zonas donde los pelos radicales están completamente desarrollados en el momento de la inoculación. Ocasionalmente, se infectan los pelos que en ese momento están en desarrollo. Bhuvanewari et al. (1980) han propuesto un modelo de "desarrollo restringido" de las células infectables. El modelo propone que las células sólo pueden ser infectadas durante un tiempo determinado de su desarrollo y únicamente las que se localizan en la región de la raíz justo debajo de la zona de los pelos radicales más pequeños y encima de la zona de la raíz de rápida elongación.

Experiencias de inoculaciones puntuales y retardadas han demostrado que la infectibilidad de las células epidérmicas de soja, es una propiedad transitoria, como cabría esperar del modelo de "desarrollo restringido" de la nodulación indicado antes (Bhuvanewari et al., 1980). La infectibilidad es adquirida y perdida acrópetamente a lo largo de un periodo de alrededor de cinco horas en el caso de la soja.

En estudios sobre la localización y desarrollo de las células radicales infectables, en otras leguminosas, se ha indicado que existe similitud y diferencias con respecto

al patrón descrito para la soja. De hecho, la infectibilidad transitoria de las células epidérmicas en desarrollo se ha puesto en evidencia en cowpea, alfalfa y trébol (Bauer et al., 1980).

Infektividad de Rhizobium

Se ha dicho que las células radicales que pueden llegar a ser infectadas y dar lugar a nódulos desarrollados constituyen una pequeña proporción del total de las células de los pelos radicales. Además hay evidencias que sugieren que algo semejante ocurre con el Rhizobium, sólo una pequeña fracción de las células de un cultivo ordinario de laboratorio son infectivas en el momento de la inoculación (Bhuvanewari et al., 1977). Los resultados de Bhuvanewari et al. (1980) sugieren que sólo una célula de cada 5 a 20 es infectiva.

Al examinar si las células de Rhizobium deben o no ser móviles para poder producir infecciones (Napoli y Albersheim, 1980 a) se ha demostrado que la movilidad y la quimiotaxia no son requeridas para la infección y posterior desarrollo del nódulo. Sin embargo, aún cuando no sea requerida, la movilidad puede conferirle ventajas significativas bajo ciertas condiciones "in vivo". Tales ventajas pueden no ser detectadas bajo condiciones de inoculación saturante "in vitro".

Una característica importante de las células de Rhizobium infectivas es la síntesis de polisacáridos (Ljunggren, 1969; Dazzo y Hubbell, 1975; Napoli y Albersheim, 1980 b). Se ha descrito que estas bacterias producen varios tipos diferentes de polisacáridos superficiales: Exopolisacáridos, o polisacáridos extracelulares (EPS), polisacáridos capsulares (CPS), lipopolisacáridos (LPS), glucanos con distintas uniones, etc., (Carlson, 1980). Los estudios sobre la producción de distintos polisacáridos necesarios en la infec-

ción y nodulación son controvertidos. Sanders et al. (1978), indicaron que la síntesis de EPS era requerida para la nodulación. Dazzo et al. (1976), han descrito que las lectinas de trébol se unen a las células capsuladas de R. trifolii. Hubbell y Elkan (1967), establecen que la producción de EPS es una característica del R. japonicum necesaria para que en mutantes de soja que normalmente no nodulan, se produzcan nódulos. Todos estos y otros muchos estudios indican que la formación de la cápsula y/o la síntesis de EPS, pueden ser necesarios para la infección y consiguiente nodulación aun que las experiencias no son definitivas. Recientemente se ha puesto de manifiesto que la modificación química de los EPS de R. meliloti no sólo inactiva su efecto positivo mostrado sobre la nodulación de alfalfa, sino que puede llegar a inhibir tal nodulación (Olivares et al., 1984).

Reacción de curvatura del pelo radical "curling"

La primera respuesta evidente del huésped, después de la inoculación es el encurvamiento del pelo radical. Esta respuesta fue descrita por Ward hace casi cien años (Ward 1887). Actualmente, se sigue sin saber que sustancias producidas por Rhizobium induce al "curling" o encurvamiento del pelo radical, así como la naturaleza de los factores responsables del proceso.

Durante algún tiempo se pensó que el ácido indol-acético producido por Rhizobium, era el responsable de la deformación de los pelos radicales. La participación de las auxinas es, sin embargo, objeto de controversias, ya que si bien Key et al. (1967) afirman que son necesarias para la síntesis de nuevas enzimas que permitan la deformación del pelo, Bergersen (1978) mantiene que no intervienen específicamente porque su adición no produce una "curvatura marcada" del pelo radical. Además, la auxina por sí sola y en un amplio rango de concentraciones causa deformación del pelo pero no el "curling" característico, resultante de las interacciones con Rhizobium (Fåhræus y Ljunggren, 1967).

Yao y Vincent (1976) revisan la información existente y concluyen que al menos hay dos factores implicados en la deformación del pelo, uno presente en los filtrados de cultivos de Rhizobium parcialmente dializable y termoes

Se han descrito tres categorías de deformación: ramificación, moderada curvatura si el pelo se curva entre 90 - 180° y curvatura marcada, cuando el pelo se curva más de 180° (Yao y Vincent, 1969). Sólo en el caso de una curvatura marcada se puede hablar de una gran especificidad, que ocurre únicamente cuando existe un contacto físico continuo con el Rhizobium infectivo, (Yao y Vincent, 1976 ; Broughton, 1978).

Sobre el mecanismo del "curling" no existe mucho material bibliográfico. Bauer (1981) propone un modelo basado en lo poco que se conoce de la estructura y desarrollo del pelo radical. El modelo argumenta que las paredes celulares de los pelos radicales están compuestas por dos capas distintas. La capa α flexible y continua a lo largo de todo el pelo y la capa β que es ligeramente rígida, interna a la capa α y no es continua. Ambas están formadas por microfibrillas de celulosa orientadas en un plano paralelo a la membrana plasmática del pelo, con polisacáridos pécticos y hemicelulosas formando una matriz amorfa.

La célula del pelo radical se desarrolla a partir de una célula epidérmica corta denominada tricoblasto (Bal et al., 1978). De esta célula epidérmica emerge el pelo. La capa externa flexible (capa α) se abulta hacia afuera como resultado de la presión de turgor contra el área localizada donde falta la capa interna. La supresión localizada de la capa β parece ser consecuencia de una desintegración de la

matriz microfibrilar o inhibición de la síntesis de dicha -
capa. Como consecuencia, cualquier célula bacteriana ligada
al ápice emergente será gradualmente desplazada desde el ápi-
ce hacia el borde del hemisferio abultado.

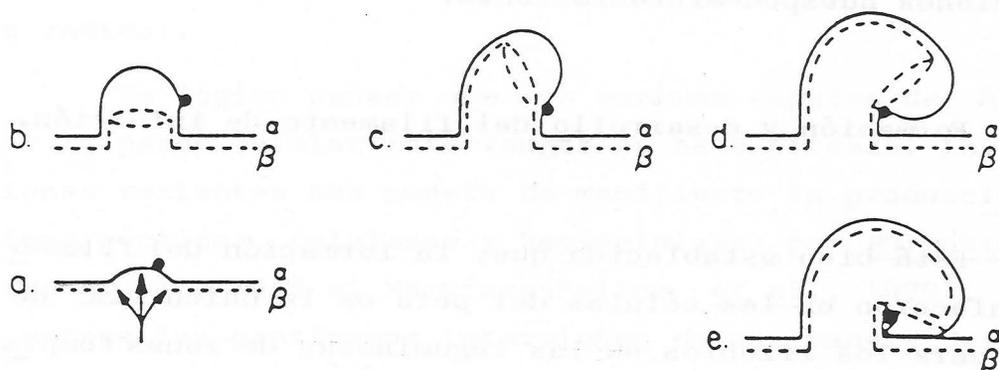


Figura 2.- Modelo propuesto por Bauer para la inducción -
del curling del pelo radical por Rhizobium.

El modelo propone que el "curling" resulta de una inhibición localizada de la síntesis de la capa β en el pelo que emerge inducida por una célula de Rhizobium ligada. Es decir, la capa β interna a la capa α , se deposita sólo por el lado opuesto al Rhizobium ligado. Al mismo tiempo que el pelo se elonga, el ápice hemisférico flexible gira gradualmente alrededor de la bacteria ligada envolviendo al Rhizobium.

Parece probable que la función biológica del "curling" en los pelos radicales sea, envolver y encerrar el Rhizobium ligado a la superficie de las células epidérmicas de la raíz (Fåhræus y Ljunggren, 1967). Esta unión de Rhizobium a la superficie radical es polar de forma que el eje más largo de la bacteria queda perpendicular a la rizoplana (Broughton, 1978). Además la formación de una cavidad que

encierra a la bacteria puede servir para aumentar, sustancialmente, la concentración de nutrientes para el microsimbionte así como la concentración de señales y efectores procedentes del mismo. La pared envolvente proporciona algo sólido contra quien empujar, al tiempo que se inicia el filamento de infección en el punto de contacto donde la estructura de la pared celular se ha relajado por efecto de las interacciones huesped-microsimbionte.

Formación y desarrollo del filamento de infección.

Está bien establecido que, la formación del filamento de infección en las células del pelo es la única vía de entrada para los rizobios en las leguminosas de zonas templadas, tanto forrajeras como de grano (Dart, 1974).

Napoli y Hubbell (1975) demostraron que el filamento de infección mostraba una continuidad con la pared celular del pelo. Esto se pudo comprobar mediante la microscopía electrónica (Higashi, 1966). Estos trabajos apoyan la hipótesis de Nutman (1952), según la cual el filamento de infección, que se origina en el punto donde el "curling" es más agudo, se forma como una invaginación de la pared del pelo radical.

Los recientes estudios de Callaghan (1979) superan todos los intentos previos en este difícil problema. Estudiando secciones secuenciales de pelos radicales de trébol, infectados, observó que el filamento de infección no era una invaginación del ápice del pelo radical, sino más bien se inicia en un punto donde dos porciones de la pared del pelo encorvado o ramificado forman una oquedad. Indicó que dentro de esa oquedad, donde se inicia el filamento tenía lugar una degradación o desintegración de la pared celular del pelo. Callaghan (1979) concluyó que "las células de Rhizobium penetran directamente la pared del pelo radical, por un pro

ceso que implica degradación de los polisacáridos de la pared celular en un punto localizado". La aparente continuidad de la pared del cordón con la pared original del pelo se debía a la síntesis de una nueva capa de pared. Esta nueva pared del filamento no era de callosa, pues no reacciona histoquímicamente como la callosa (Kumarashinge y Nutman, 1977) sino fibrilar y de naturaleza semejante a la pared del pelo radical.

Es lógico pensar que los enzimas capaces de hidrolizar la pared celular intervengan en este proceso. Investigaciones recientes han puesto de manifiesto la producción de enzimas pécticos, celulasas y hemicelulasas por Rhizobium, (Verma et al., 1978 a; Martínez-Molina et al., 1979). Según parece las pectinasas intervienen de una manera destacada en los primeros estadios de la infección (Napoli y Hubbell, 1975; Chandler, 1978; Martínez-Molina y Olivares, 1982), mientras que la hemicelulasa y celulasa actuarían en la rotura de los filamentos de infección que liberan bacterias en las células de la corteza radical. La antigua hipótesis de la inducción por la bacteria de producción de poligalacturonasa por las células radicales, carece de insuficiente apoyo experimental (Ljunggren y Fåhraeus, 1959) en la actualidad.

Desarrollo del filamento de infección

El filamento de infección es una vaina circular cuya superficie interna está formada por celulosa y rodeada por la membrana plasmática de la célula huésped (Verma et al., 1978 a) en su interior se encuentran las bacterias unidas extremo a extremo e inmersas en una matriz de polisacárido. El núcleo de la célula infectada, generalmente, se sitúa junto al punto donde se inicia el filamento de infección, adquiere un tamaño casi dos veces el normal y se mueve hacia la base del pelo, delante del ápice del cordón en crecimiento.

El filamento crece a una velocidad de $7 \mu\text{m}/\text{h}$ aproximadamente, similar a la velocidad de crecimiento de la célula del pelo (Nutman, 1965 ; Dart, 1977). La bacteria situada en el ápice del filamento de infección puede continuar dividiéndose, mientras que las otras quedan constreñidas por las paredes del filamento.

El crecimiento del filamento de infección probablemente tiene lugar por aflojamiento de la celulosa de la pared bajo la influencia de la auxina producida en el interior de la vaina por Rhizobium (Bergersen, 1978) o bajo la influencia de enzimas hidrolíticos, celulasas y peptinasas, las cuales se han detectado en las paredes del filamento de infección en nódulos de soja (Verma et al., 1978a, 1978 b). La actividad celulasa parece ser de origen vegetal y la pectinasa de origen bacteriano, lo cual es consistente con los estudios de Martínez-Molina et al., 1979).

El filamento de infección crece desde el pelo radical hasta el interior del córtex a través de las células, de la corteza y a menudo con ramificaciones. El proceso por el cual el cordón puede atravesar la pared celular basal del pelo radical al interior de la célula adyacente, no es bien conocido. Sin embargo, por microfotografías (Newcomb, 1976) se ha observado que en el proceso se combinan la presión ejercida por las bacterias dividiéndose en el ápice del filamento, acoplada con la síntesis de membrana plasmática vegetal y la degradación y nueva síntesis del material de la pared celular (Morre y Mollenhauer, 1974). Por tanto las bacterias, siempre estarán rodeadas por la pared del filamento de infección. Se formará, así, el filamento intercelular entre la célula del pelo radical y la célula adyacente cortical.

Otras formas alternativas de infección,

Existen leguminosas infectadas en las que no se observa el filamento de infección (Dart, 1974). Es posible que se desintegre antes del examen, como se ha visto en nódulos viejos de soja (Goodchild y Bergersen, 1966). Sin embargo, Dart (1974), señala que los nódulos, en los que no se forma filamento de infección, todas las células están invadidas por bacterias mientras que en los nódulos con filamento hay células no infectadas. A la vista de esto parece ser que el Rhizobium puede infectar a las leguminosas por un mecanismo diferente según formen o no filamentos de infección (Dart, 1974).

El estudio de Chandler (1978) suministra un modelo alternativo de infección. Observó en raíces de cacahuete , que las infecciones se inician en la unión entre la célula del pelo y la epidérmica adyacente, luego progresan intercelularmente a través de la lámina media. Esto generalmente , se produce en las zonas de aparición de raíces laterales. El movimiento de Rhizobium desde la lámina media al interior del citoplasma de la célula huésped, parece implicar la alteración o desintegración de la pared celular y el envolvimiento de la bacteria en una estructura membranosa. En este tipo de nódulos, todas sus células están infectadas ya que provienen de la división de las primeras células que se habían infectado.

2.3.2.- Iniciación e Infección del Meristemo Nodular.

Durante el crecimiento del filamento de infección a través de las capas de células más externas del córtex, se inicia una actividad meristemática en un pequeño grupo de células delante del ápice del filamento y en la zona profunda de la corteza radical (Newcomb et al., 1978). El crecimiento del filamento de infección continúa dentro de esta región meristemática donde las bacterias son liberadas desde el ápice del filamento al interior del citoplasma de las células meristemáticas más internas.

Las células meristemáticas que llegan a ser infectadas por las bacterias, son predominantemente disomáticas - (Dart, 1974). El resto de la zona meristemática se compone de células diploides que se dividen y forman un sistema radial de células intersticiales no infectadas, dentro del nódulo maduro. Estas células, probablemente sirven para mejorar la difusión gaseosa a través del nódulo (Goodchild, 1978).

La liberación de Rhizobium, dentro de las células del huésped, se realiza por un proceso de endocitosis en el cual quedan envueltos por una membrana de origen vegetal que se denomina membrana peribacteroidea. Esta liberación también está relacionada con la ausencia de la pared celular en el ápice del filamento de infección. Robertson et al. (1978a) proponen que la carencia de pared es debido a un cambio en la función del aparato de Golgi, de tal forma que mantiene la síntesis de la membrana plasmática y disminuye la síntesis de la pared celular. También puede ser incrementada la actividad celulolítica y pectinolítica en el ápice del filamento, dentro de las células de la corteza radical (Verma et al., 1978 a; 1978 b).

Las bacterias que viven intracelularmente en los nódulos activos rodeadas de la membrana peribacteroidea pueden continuar dividiéndose y se transforman en bacteroides. Estos se distinguen de las formas normales en su morfología

poseen alteraciones en los citocromos y otros componentes de la cadena de transporte de electrones (Evans y Russell, 1971) y contienen nitrogenasa activa. Las células infectadas de bacterias contienen al principio amiloplastos, mitocondrias y pequeñas vacuolas. A medida que el citoplasma se llena de bacteroides, las vacuolas se unen, quedando los amiloplastos y las mitocondrias en menor número, localizadas en la periferia de las células infectadas (Phillips et al., 1976).

2.3.3.- Desarrollo del Tejido Nodular.

La distribución espacial que adoptan las células meristemáticas en división, determina que los nódulos de las leguminosas tengan formas y estructuras diferentes. Sprent, (1979) reconoce dos tipos de nódulos, nódulos de crecimiento determinado y nódulos de crecimiento indeterminado.

Los nódulos determinados se forman a partir de un meristemo de crecimiento definido, tienen un sistema vascular continuo, dicotomizado y cerrado. El filamento de infección no es el principal medio de distribución de las bacterias en los nódulos. La senescencia se inicia en la zona central del nódulo, la endodermis es cerrada y forma externamente una gruesa capa esclerotizada. En este tipo de nódulos, generalmente redondeados, los bacteroides son rechonchos, ligeramente más largos que las células normales, con un mayor contenido en DNA por célula y se encuentran encerrados en grupos de dos o más dentro de las membranas envolventes. Sin embargo, no ocupan todo el volumen quedando un espacio peribacterioideo considerable. Un ejemplo de este tipo de nódulos son los de soja.

Los nódulos indeterminados, presentan un meristemo de crecimiento apical e indefinido. El sistema vascular y la endodermis son abiertos, llegando hasta la zona indiferenciada del ápice del nódulo. El filamento de infección es

el principal medio de distribución de las bacterias en los nódulos, ya que una vez liberadas las bacterias en la región más interna del meristemo, el filamento se ramifica y vuelve, en sentido contrario, dirigiéndose hacia la epidermis de la raíz. Delante de los filamentos de infección se inicia una nueva zona meristemática, meristemo apical, donde irán apareciendo nuevas células infectadas (Syono et al., 1976). La senescencia se inicia en la base del nódulo y progresa hacia la región apical en crecimiento. En este tipo de nódulos generalmente alargados, los bacteroides son pleomórficos, pudiendo adoptar la forma de Y, T o X, mucho mayores que las formas normales (Biseling et al., 1977). Las bacterias que dan encerradas dentro de las membranas envolventes, generalmente de forma individual ocupando casi todo el volumen, por lo que el espacio peribacteroideo es muy reducido. Especies que forman este tipo de nódulos son el trébol, guisante, alfalfa, entre otras.

En este tipo de nódulos, se pueden diferenciar cinco zonas : a) Zona de células meristemáticas blancas, próximas al ápice del nódulo ; b) Zona de infección de nuevas células meristemáticas; c) Zona simbiótica inmadura, en la que los bacteroides aún continúan dividiéndose rápidamente, dentro de las células hospedadoras que contienen gran cantidad de almidón (Phillips et al., 1976); d) Zona simbiótica tardía o madura, en ella las células vegetales están completamente llenas de bacteroides fijadores de nitrógeno, tiene color rosado debido a la presencia de leghemoglobina en las células infectadas. Estas células tienen menos almidón que las infectadas en la zona simbiótica inmadura; e) Zona de tejido senescente, color marrón verdoso a causa de la degradación del grupo hemo de la leghemoglobina (Newcomb, 1976).

La longevidad de las células infectadas en los nódulos, es distinta según las leguminosas y puede ser alterada por condiciones ambientales (Goodchild, 1978).

A la vez que se origina el tejido infectado del nódulo, tiene lugar la formación del tejido no infectado a - partir de las células de la endodermis y el periciclo de la raíz, que también se dividen (Dart, 1977). Este tejido diplóide, no es penetrado por los filamentos de infección y continúa su desarrollo para conectar el tejido vascular de la raíz con los cordones provasculares del nódulo. Estos se forman a partir de células corticales adyacentes al meristemo nodular, a medida que el tejido infectado se desarrolla. La diferenciación para formar elementos del xilema y floema, se inicia en la conexión con el sistema vascular de la raíz y se extiende hacia el ápice del nódulo. Cada cordón vascular está rodeado de su propia endodermis, cuya estructura es semejante a la de la raíz. Además de la endodermis los tejidos vasculares del nódulo, también están rodeados por células del periciclo. Algunas de estas células pueden tener un citoplasma denso y elaborar gran cantidad de pared celular. Estas células especializadas del periciclo, se denominan células de transferencia y tienen un papel importante en el transporte de aminoácidos fuera del tejido infectado del nódulo, hacia el xilema y en el suministro de fotosintato desde el floema a las células del nódulo (Pate y Gunning, 1972; Pate, 1976a; Newcomb, 1979).

Externamente, cada nódulo tiene una capa endodérmica que se diferencia a partir de la de la corteza de la raíz. Esta endodermis une el ápice del nódulo con la endodermis de la raíz y puede sufrir un proceso de suberificación (Dart, 1977). Las lenticelas pueden localizarse en la capa externa y generalmente en zonas cercanas a los tejidos conductores del nódulo, ayudando a la aireación del mismo (Pankhurst y Sprent, 1975).

2.4.- Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno en los Nódulos de Leguminosas.

Está bien establecido que los bacteroides de los nódulos de leguminosas tiene el sistema enzimático necesario para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio (Bergersen, 1974). La fijación de nitrógeno en los bacteroides es tá catalizada por la enzima dinitrogenasa o nitrogenasa. Es te enzima ha sido localizada en gran variedad de microorganismos, entre los cuales se encuentran bacterias aerobias, fotosintéticas, anaerobias y facultativas, además de las cia no f i c e a s . Se puede hablar de una similitud entre todas las nitrogenasas, cualquiera que sea el organismo de que proceda (Dilworth, 1974; Evans et al., 1976). Dentro del nódulo, la enzima se localiza en el bacteroide.

2.4.1.- Estudio de la Nitrogenasa.

El complejo enzimático consta de dos proteínas. La molibdeno-ferro-proteína (PM 200.000 - 270.000) y la ferro-proteína (PM 50.000 - 60.000) ambas con azufre lábil (Bergersen, 1977).

La molibdeno-ferro-proteína consta de 4 subunidades de dos tipos diferentes y un cofactor de molibdeno (Fe Mo ∞) que puede ser el lugar de reducción del nitrógeno. El contenido de hierro varía desde 30 a 36 átomos Fe/mol de te tr á m e r o (Emerich y Burris, 1978) y el de molibdeno es de 2 átomos/mol (Yates y Planque, 1975; Orme-Johnson et al., - 1977). Se ha denominado también nitrogenasa o componente I. En esta proteína casi la mitad del contenido de hierro es tá asociado al cofactor de molibdeno. En este cofactor el hierro no puede estar como un grupo convencional 4Fe - 4S ó 2Fe - 2S, sino como un grupo que contiene molibdeno, posible mente del tipo 3Fe-Mo-4S. El resto del hierro se encuentra en grupos 4Fe - 4S (Orme - Johnson et al., 1978). Sin embargo, la estructura tridimensional de la proteína está actual

mente en estudio. El concepto de peso molecular, contenido metálico y estructura cuaternaria, son factores críticos que son necesarios resolver para entender la estructura y función de la Mo-Fe proteína.

El componente ferroproteico de la nitrogenasa, llamado también componente II o nitrogenasa reductasa, comprende 2 subunidades idénticas. Se acepta actualmente que todas las ferroproteínas contienen varios grupos 4Fe - 4S (Tanaka et al., 1978).

Los requerimientos básicos para que opere la nitrogenasa son : un reductor, un sustrato reducible, un sistema generador de ATP, iones Mg como activadores y un ambiente anaerobio. A esta complejidad hay que añadir que ni el componente I ni el II aisladamente pueden catalizar la fijación de nitrógeno, sino que se requiere su ensamblaje para la operatividad (Brill, 1977).

El funcionamiento de la nitrogenasa ha sido estudiado utilizando espectroscopía de Mossbauer, que presenta grandes ventajas para los compuestos de hierro. La ferroproteína en su forma oxidada se reduce a expensas de un donador de electrones, como la ferredoxina y flavodoxina "in vitro" podrían actuar también el metil viológeno o el ditionito sódico. Una vez la proteína reducida, acepta el complejo MgATP, experimenta un cambio conformacional (Ljones y Burris, 1978) y de potencial redox. Esta alteración es inhibida por el MgADP. De esta forma, la ferroproteína reducida y activada, es altamente reactiva, lábil al oxígeno, fácilmente puede perder el hierro y un agente reductor muy poderoso capaz de reducir a la molibdeno-ferro-proteína.

La molibdeno - ferro-proteína acepta al sustrato reducible y forma un complejo con la ferroproteína activada, unida al MgATP, produciéndose la transferencia de electrones y la hidrólisis de MgATP (Smith et al., 1972). Hageman y Burris (1978 a) argumentan que por cada par de electrones, que se transfieren de la ferroproteína, se hidrolizan 4 mo-

lécúlas de ATP. Finalmente, los electrones son transferi - dos, en número de seis, de la molibdeno-ferro-proteína reducida al nitrógeno liberándose 2NH_3 . Ambas proteínas , se reoxidan al ceder los electrones y pueden comenzar el ciclo de nuevo.

Los transportadores de electrones a la nitrogenasa, deben tener un potencial redox muy bajo para poder reducir la ferro-proteína "in vivo" puesto que el potencial redox de esta proteína es de -280 mV. Los donadores de elec trones, como la ferredoxina o flavodoxina, utilizados para reducir a la ferroproteína, han sido detectados en siste - mas fijadores de nitrógeno, pero debido a su inestabilidad ha sido necesario utilizar sistemas artificiales para ensa yarlos "in vitro" (Massey y Hemmerich, 1978).

Las flavodoxinas son flavoproteínas, con un grupo FMN por molécula, de peso molecular 16.000 ó 23.000 daltons y sustituyen a la ferredoxina en la transferencia de elec trones cuando falta hierro (Knight y Hardy, 1966). Tienen tres estados de oxidación : completamente oxidada, semiqui nona y completamente reducida o hidroquinona, cada uno con un espectro UV característico (Yates, 1972). Las ferredo xinas, peso molecular entre 24.000 y 55.000 daltons, son fe rroproteínas con grupos $4\text{Fe} - 4\text{S}$, no se puede precisar que átomo de Fe está involucrado en la oxido-reducción, pues to do el centro se comporta como un reductor único (Yates et al., 1978 ; Yates, 1980).

Un aspecto arduo ha sido la determinación del donador de electrones fisiológico a la nitrogenasa. Beneman, et al. (1971), propusieron un sistema en el cual el donador de electrones es el NADPH e interviene la ferredoxina, la flavodoxina y una proteína desconocida. Este modelo fué apoyado por Wong et al. (1971) y criticado por Haaker et al. (1974). Un esquema alternativo fue propuesto por Vee ger et al. (1979), en él se requiere una membrana energé tica que puede ser fácilmente dañada, eso explicaría la ba

ja actividad nitrogenasa en extracto de Azotobacter, con donadores fisiológicos de electrones. En este esquema interviene una flavodoxina hidroquinona que es quien cede los electrones directamente a la nitrogenasa. Este modelo está apoyado por la detección de una flavodoxina oxidoreductasa, dependiente del NADH encontrada en Azotobacter y en Rhizobium (Veeger et al., 1979). El esquema de transporte de electrones, por tanto serviría para bacteroides de Rhizobium. En este esquema, el NADH y el gradiente quimiosmótico a través de membrana, son usados para reducir la flavodoxina semiquinona a su forma hidroquinona, la cual puede reducir a la nitrogenasa.

Sustratos reducibles por la nitrogenasa.

La nitrogenasa es un enzima versátil y reduce varios tipos de sustratos (McKenna et al., 1976) particularmente, isoésteres con triple enlace, el sustrato natural N_2 , los protones procedentes del agua, el acetileno, óxido de nitrógeno, etc. Rivera-Ortiz y Burris (1975), señalan que existen evidencias a favor de que las reducciones tienen lugar en sitios activos distintos y de forma diferente. Los estudios de la cinética de interacción entre pares de sustratos (Hwang et al., 1973) demuestran que en el sitio de reducción del nitrógeno, también se reduce posiblemente el N_2O pero no otros sustratos; las azidas y el cianuro se reducen, en el mismo sitio, el cual es diferente del sitio de reducción del acetileno, el sitio donde se reducen los protones también es único. Esto quiere decir, que hay al menos cuatro sitios de enlace diferentes, para la reducción de sustratos, o formas del enzima.

Un esquema del funcionamiento de la nitrogenasa según Sprent (1979) se expone en la Figura 3.

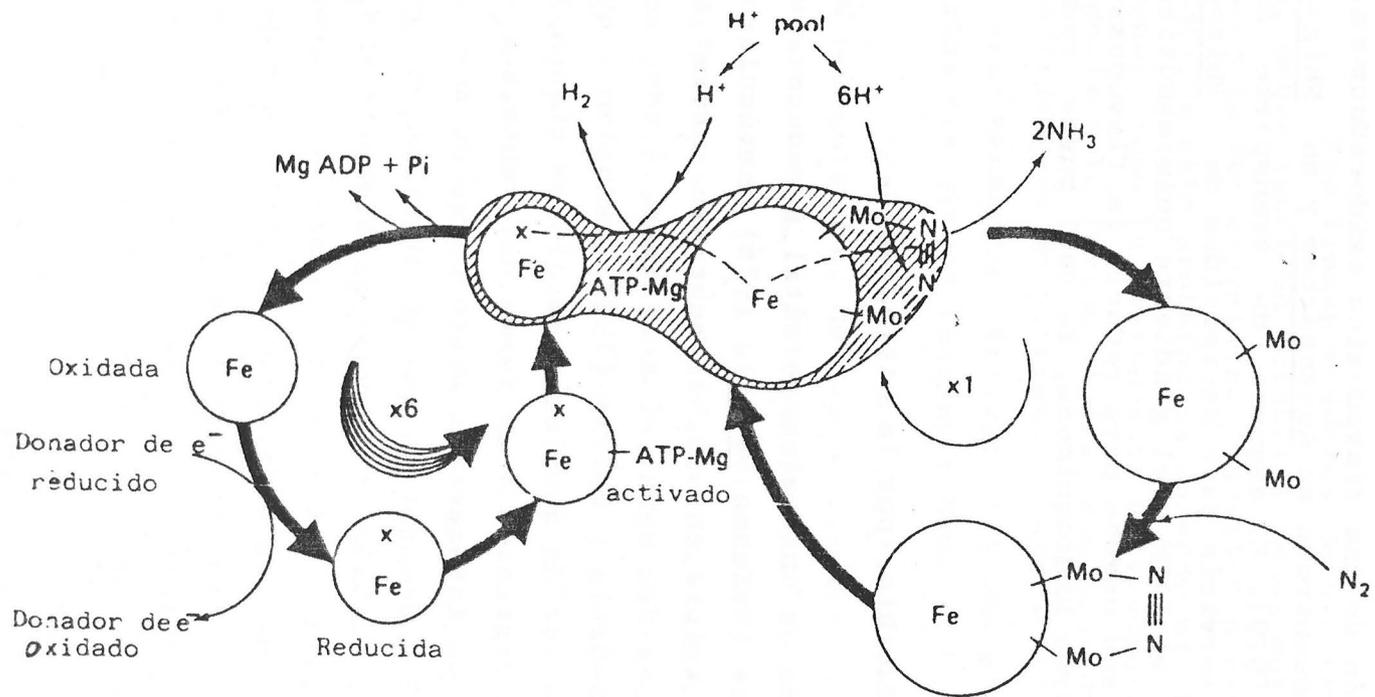


Figura 3.- Esquema del funcionamiento del complejo enzimático, nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico.

Control de la nitrogenasa.

El principal control de la actividad nitrogenasa, se ejerce a nivel del ATP, que se requiere como fuente de energía. La actividad del enzima, mantiene una respuesta lineal con el incremento de la carga energética, necesitando un pequeño umbral de energía por debajo del cual es inactiva (Appleby et al., 1975). De forma indirecta, el control de la actividad nitrogenasa puede ejercerse a nivel de la compartimentación de electrones entre la reducción de nitrógeno y la producción de H_2 dependiente del ATP (Dixon, 1972 ; Bethlenfalway et al., 1978).

El control de la biosíntesis de la nitrogenasa ha sido estudiado en Klebsiella. Se ha comprobado que se ejerce a través de la glutamina sintetasa, enzima que estimula la síntesis de la nitrogenasa (Streicher y Valentine, 1977). La actividad de la glutamina sintetasa está controlada por la adenilación de las subunidades del enzima, siendo la enzima desadenilada necesaria para la síntesis de la nitrogenasa - (Kennedy y Eady, 1979). Cuando la glutamina está en concentraciones elevadas, se activa el sistema de adenilación, convirtiendo a la glutamina sintetasa en su forma adenilada, que es la forma inactiva del enzima. La enzima adenilada está implicada en la represión del operón nif (operón que codifica el enzima nitrogenasa), siendo la glutamina sintetasa desadenilada la directamente implicada en la transcripción del DNA nif (Streicher y Valentine, 1977).

Otro sistema de control de la nitrogenosa lo puede ejercer el amonio, inhibidor de su síntesis. Se ha propuesto que, el amonio produce una represión de la actividad de la glutamina sintetasa, e incrementa su estado de adenilación (Bergersen y Turner, 1976). La inhibición de la síntesis de la nitrogenasa por el amonio, está mediada por la adenilación de la glutamina sintetasa, provocada por un aumento de la glutamina.



El control de la biosíntesis de la nitrogenasa en Rhizobium es controvertido. Bergersen y Turner (1978), encuentran una correlación positiva entre la actividad nitrogenasa y el nivel de glutamina sintetasa desadenilada en cultivos de Rhizobium. Estos autores detectan que el exceso de amonio no reprime la nitrogenasa en cultivos con O_2 limitante. Esta observación podría explicar, porqué la nitrogenasa parece ser desreprimida en bacteroides de Rhizobium, los cuales producen el amonio en exceso y lo excretan en contraste con Klebsiella cuyo exceso de amonio reprime la síntesis de la nitrogenasa (Tyler, 1978).

La presencia de glutamina sintetasa en pequeñas cantidades en el bacteroide, en comparación con la que existe en la célula hospedadora, induce a creer que este enzima puede jugar el mismo papel en su doble forma, adenilada y no adenilada que se le ha atribuido en fijadores libres. Sin embargo, esta hipótesis está descartándose al encontrar que otros genes distintos a Gln A, son los que juegan el papel decisivo en la activación - desactivación de los genes responsables de la fijación. Habrá que esperar algún tiempo para conocer qué ocurre en Rhizobium aunque ya se sabe, que el producto del gen nif A de Klebsiella activa la transcripción de los genes estructurales responsables de la síntesis de la nitrogenasa en R. meliloti e incluso el producto del gen Gln G, uno de los genes ligados al Gln A, (de la GS) también activa la transcripción (Merrick, 1982; Ow y Ausubel, 1983).

2.4.2.- Asimilación del Amonio

Los estudios iniciales realizados con nódulos de Serradella (Kennedy et al., 1966) indicaron que el amonio producido en la fijación de nitrógeno era asimilado en los bacteroides. Esto fue cuestionado (Bergersen y Turner, 1967) cuando se detectó que en bacteroides aislados y en Rhizo-

bium en vida libre se excreta, el 90 % del nitrógeno fijado como amonio. Se estableció que la mayor parte del amonio pasaba a la fracción citoplasmática de las células hospedadoras del nódulo (Robertson y Farnden, 1980).

La cuestión de porqué Rhizobium excreta el amonio, formado en la fijación de nitrógeno es intrigante, sin embargo, contribuye a maximizar los efectos positivos de la simbiosis. El amonio es un represor de la síntesis de la nitrógenasa (Tyler, 1978) a nivel de la transcripción del ADN de forma que en presencia del amonio no se sintetiza el enzima.

En el bacteroide los niveles de enzimas de la asimilación de amonio, glutamina sintetasa (GS) glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH), son demasiado bajos para asimilar todo el amonio producido en la fijación de nitrógeno (Werner y Stripf, 1978).

Sin embargo, la actividad de los enzimas de la asimilación del amonio en la célula hospedadora del nódulo, es muy apreciable (Robertson et al., 1975 a). Además, durante el desarrollo del nódulo, cuando se incrementa el nivel de leghemoglobina y la actividad nitrogenasa, (Scott et al., 1976) la actividad GS se estimula en la fracción vegetal. Todo ello indica que la asimilación del amonio tiene lugar en el citoplasma de las células hospedadoras del nódulo.

La glutamina es el primer producto orgánico estable formado. Se ha descrito ampliamente que la vía de asimilación del amonio es a través del sistema GS/GOGAT (Robertson et al., 1975 b; Mifflin y Lea, 1976). A este sistema Rhodes et al. (1980) lo denominó ciclo de la glutamato sintasa. La glutamina sintetasa necesita ATP, iones Mg^{++} y glutamato para fijar el amonio y formar glutamina. Tiene una K_m muy baja y su actividad está correlacionada con la actividad de la nitrogenasa, que se incrementa con el desarrollo de los nódulos. La glutamato sintasa requiere NADH procedente del fotosintato, via glucolisis, y un cetoácido, especí-

ficamente el α - cetoglutárico (Boland et al., 1980).

La glutamato deshidrogenasa tiene escaso papel en el metabolismo del amonio en los nódulos de leguminosas, el nivel detectado ha sido mínimo excepto en trébol blanco. Posiblemente porque este enzima tiene una Km muy alta y requiere niveles de amonio elevados para que sea eficiente, niveles que podrían inhibir la nitrogenasa (Gibson et al., 1977).

Los mecanismos de regulación de estos enzimas en los nódulos de leguminosas no se conocen bien (Dilworth, 1979). Hay autores que proponen una posible inhibición "feedback" por aminoácidos suministrados por la planta (Boland et al., 1980). Otros autores proponen que el amonio causa una represión de la actividad glutamina sintetasa e incrementa el estado de adenilación del enzima (Upchurch y Elkan, 1978b). De hecho, la glutamina sintetasa de los bacteroides de numerosas leguminosas ha sido aislada y caracterizada (Robertson et al., 1975 a; Boland et al., 1980), encontrándose adenilada, en contraste con la existente en el citosol de la planta hospedadora que no está adenilada. Planque et al. (1978) detectaron en el bacteroide de R. leguminosarum que el nivel de glutamina sintetasa adenilada disminuía durante el periodo de desarrollo del nódulo, cuando la actividad nitrogenasa estaba incrementando. Parece ser que existe una correlación positiva entre la actividad nitrogenasa y el nivel de sintetasa no adenilada (Bergersen y Turner, 1978). Por tanto, se podría pensar que la glutamina sintetasa no adenilada es requerida para activar la síntesis de la nitrogenasa en Rhizobium.

Un esquema del metabolismo integrado del nódulo se expone en la Figura 4.

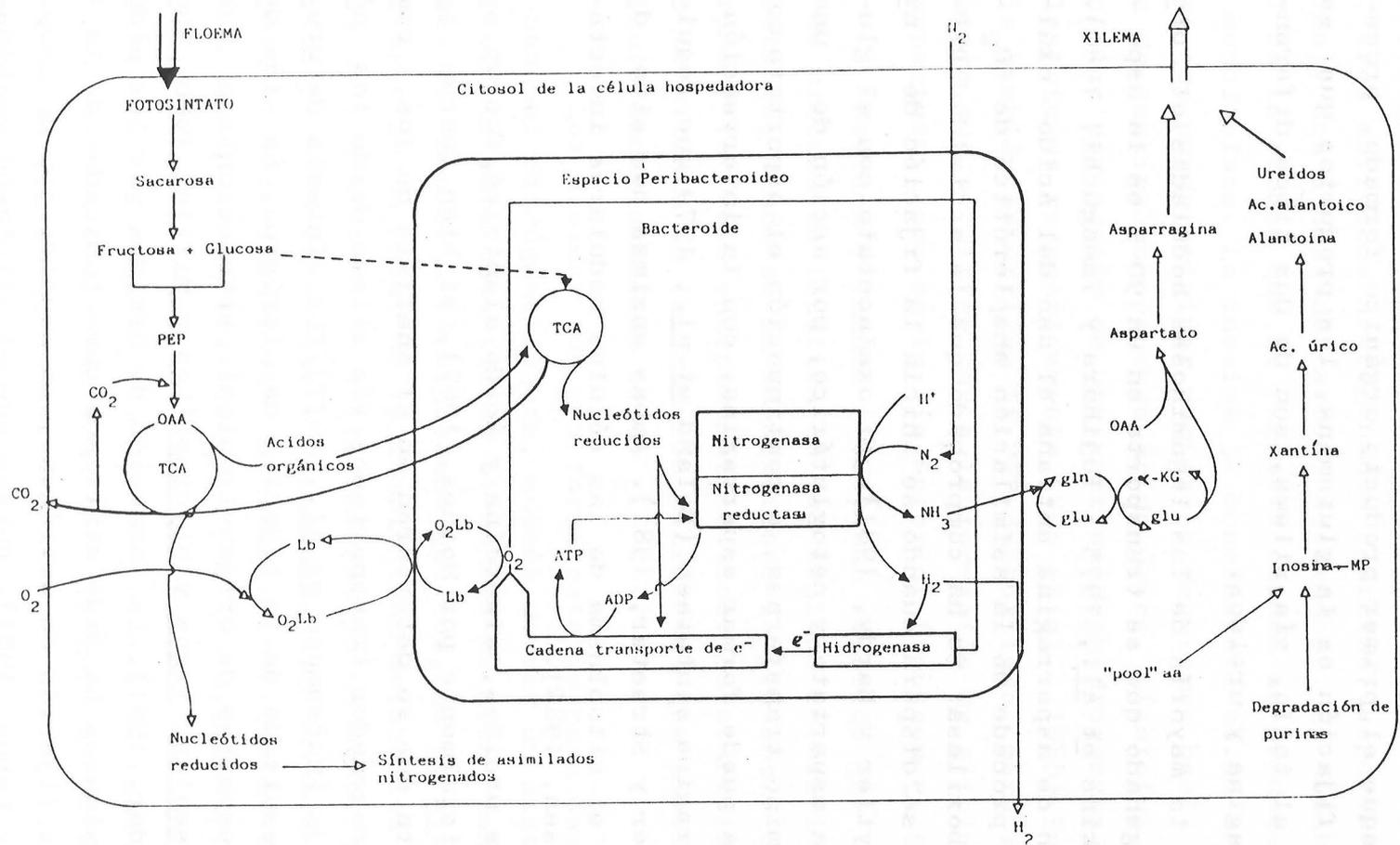


Figura 4.-Esquema del metabolismo integrado en los nódulos radicales.

2.4.3.- Transporte de los Asimilados Nitrogenados.

Aunque el primer producto orgánico formado, procedente de la fijación es la glutamina, los productos que se transportan al tallo, vía xilema, son de dos tipos diferentes: asparragina y ureidos.

En la mayoría de las leguminosas noduladas el producto nitrogenado que se transporta en un 90 % es la asparragina (Atkins et al., 1975 ; Fujihara y Yamaguchi, 1980). La formación de asparragina entraña el uso del ácido oxalacético que procede de la asimilación anaplerótica de CO₂ - vía PEP-carboxilasa. Se ha comprobado que la actividad PEP-carboxilasa se dispara cuando se inicia la fijación de nitrógeno (Heytler y Hardy, 1981). El oxalacetato con el glutamato forma aspartato y cetoglutárico, por acción de una aspartato amino transferasa, a continuación el aspartato con la glutamina puede formar asparragina, con la intervención de la asparragina sintetasa (Boland et al., 1979) que requiere ATP (Huber y Streeter, 1981). Ambas enzimas han sido detectadas en el citoplasma de las células nodulares infectadas (Bergersen, 1982).

Los ureidos, alantoína y ácido alantoico, fueron estudiados inicialmente por Mothes (1961), si bien fueron ignorados hasta que se detectaron en el análisis de los compuestos nitrogenados transportados vía xilema desde los nódulos de soja (Matsumoto et al., 1977). La síntesis de ureidos, como resultado de la fijación de nitrógeno, ha sido detectada en especies de origen tropical perteneciente a los géneros Phaseolus, Vigna y Glycine (Lea y Mifflin, 1980; Tho^mas y Schrader, 1981). La formación de ureidos por los nódulos de leguminosas ha sido utilizada como indicador de la capacidad de fijación de nitrógeno, en condiciones de campo (Patterson y LaRue, 1981), puesto que el nitrógeno combinado del suelo cuando se absorbe por la raíz, no se transporta como ureidos, por tanto estos compuestos se forman exclusivamente en tejidos nodulares.

La síntesis ha sido dilucidada por Triplett et al. (1980). Sigue la vía de degradación de las purinas, requiere ATP, tres derivados nitrogenados (glicina, aspartato y glutamina) y dos átomos de carbono activados. El metabolito inicial es la ribosa que se regenera cuando se produce inosina 5 - monofosfato. La inosina 5- monofosfato es un metabolito clave que puede originar purinas o desviarse hacia la formación de xantina que produce ácido úrico, alantoína y ácido alantoico por acción de una xantina deshidrogenasa, uricasa y alantoicasa respectivamente (Woo et al., 1980). En esta síntesis también se utiliza la PEP-carboxilasa, para formar oxalacetato que se dirige hacia la formación de glicina en vez de aspartato, como en la vía anterior (Cookson et al., 1980).

Newcomb y Tandon (1981) han sugerido que la síntesis de ureidos se localiza en los tejidos intersticiales no infectados, donde se ha identificado la presencia de microcuerpos y retículo endoplasmático liso. La alantoinasa ha sido localizada en la fracción microsomal que proviene del retículo endoplasmático liso.

Los ureidos son una forma estable para mantener almacenado el nitrógeno fijado, además de ser un sistema rápido y eficaz para detoxificar el nódulo de altas concentraciones de amonio. En términos energéticos, Lea et al. (1982) concluyen que a pesar de la complejidad metabólica de la síntesis de los ureidos su coste energético es menor que el requerido para la biosíntesis de la asparragina. Otra ventaja, que presenta el transporte de ureidos respecto al transporte de asparragina es la relación C/N. Los ureidos presentan una relación C/N menor que la asparragina, lo que implica que los ureidos requieren menos esqueletos carbonados, para transportar una misma cantidad de nitrógeno asimilado, que la asparragina (Farnden, 1981).

El transporte de los compuestos nitrogenados procedentes de la fijación de nitrógeno, desde los nódulos, es un proceso que cambia dinámicamente durante el crecimiento

de la planta. Generalmente, la mayor parte del nitrógeno fijado durante el periodo vegetativo, se acumula en las hojas pudiendo ser utilizado posteriormente en el llenado de la se milla cuando decae la fijación de nitrógeno como respuesta a la falta de fotosintato a los nódulos. Es importante que los asimilados nitrogenados sean rápidamente transportados a los lugares de utilización, órganos vegetativos o reproductores.

Gunning et al. (1974) consideraron que las células de transferencia intervienen activamente en los procesos de carga y descarga de compuestos en el nódulo. Interviene tan to en la importación de fotoasimilados al nódulo, como en la exportación de los compuestos orgánicos nitrogenados. A través de ellas se pueden exportar los aminoácidos en concen traciones mucho más elevadas de las que pueden ser secreta - das a través de los espacios intercelulares (Pate y Gunning, 1972). La secreción está facilitada por un flujo osmótico de agua a través de la vaina endodérmica hasta el xilema del nó dulo, que conecta con el del sistema vascular de la raíz.

Las células de transferencia se han encontrado casi exclusivamente en nódulos de crecimiento indeterminado (Tribu Viciae y Trifoliae) mientras que en nódulos determinados, (Tribu Phaseolae) están ausentes. No obstante Sprent (1980), ha descrito la presencia de numerosas células de transferen - cia en el parénquima xilemático de las raíces de soja, cerca nas a donde se localizan los nódulos.

La glutamina y asparragina después de ser exporta - das a otras partes de la planta pueden ser utilizadas direc tamente en la síntesis de proteína o participar en otros pro cesos metabólicos. En cambio, los ureidos deben ser primera - mente degradados a urea y glicolato, siendo la urea cataboli zada posteriormente hasta amoniaco y dióxido de carbonó (Tajima, et al., 1977). El amonio debe ser asimilado de nuevo, en for ma de aminoácidos, para ser utilizado en los distintos proce sos metabólicos. Todas estas transformaciones tienen lugar - en las hojas.

2.5.- Aspectos Fisiológicos de la Fijación de Nitrógeno.

2.5.1.- Protección de la Nitrogenasa Contra el Daño Causado por el Oxígeno.

Además de ser las proteínas de la nitrogenasa muy sensibles al oxígeno, su biosíntesis es inhibida por este elemento a nivel de transcripción por una regulación parecida, al menos en Klebsiella, a la del amonio. Por lo que deben existir mecanismos o estructuras que o bien excluyan el oxígeno de las proximidades del enzima o alternativamente transformen los sitios susceptibles al oxígeno en tolerantes al mismo (Dalton y Postgate, 1969). Veamos los mecanismos de protección en los distintos fijadores de nitrógeno.

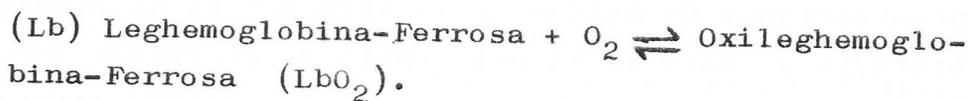
En organismos anaerobios no se presenta este problema, sin embargo en aerobios, las estrategias que adoptan, son distintas. Estos organismos pueden rodearse de una capa mucosa que actúa en barrera dejando difundir el oxígeno adecuado. En otras ocasiones se produce la eliminación metálica del mismo por una respiración intensa mediante la cual se suprime el oxígeno que puede afectar a la fijación de nitrógeno. Haddock y Jones (1977) denominan a este mecanismo "Protección respiratoria" y proponen, para Azotobacter, la existencia de dos cadenas respiratorias, una que funciona con altas concentraciones de oxígeno y la otra con bajos niveles. Otra estrategia se basa en la existencia de proteínas que protegen a la nitrogenasa cubriéndola en los sitios sensibles al oxígeno. Estas proteínas no están bien caracterizadas aunque en Azotobacter se postula la existencia de una proteína con hierro y azufre que se asocia a la nitrogenasa inactivándola reversiblemente cuando hay concentraciones altas de oxígeno (Haaker y Veeger, 1977; Robson, 1979). Las algas verde-azules desarrollan unas células especializadas, denominadas heterocistes, distintas de las células vegetativas que carecen de FS II, no pueden fijar el dióxido de carbono, ni liberar

oxígeno. La nitrogenasa se restringe únicamente a los heterocistos por lo que existe una compartimentación espacial de la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Bothe et al., 1980).

En los nódulos de raíces de leguminosas la estrategia seguida frente al oxígeno es más compleja, interviene un pigmento soluble de color rojizo, llamado leghemoglobina que es el encargado de suministrar el oxígeno a los bacteroides, a la concentración adecuada, para que pueda producirse la energía suficiente sin inactivación o inhibición de la nitrogenasa.

2.5.2.- Leghemoglobina : Localización y Función.

La primera vez que se describió a la leghemoglobina, se identificó como una hemoglobina que sufría una oxigenación reversible en respuesta a los cambios de oxígeno en el ambiente (Kubo, 1939). Pronto se encontró que la leghemoglobina estaba presente en los nódulos en concentraciones - que frecuentemente se correlacionaban con la efectividad de la simbiosis (Virtanen, 1955). Keilen y Smith (1947) confirmaron por espectroscopía la oxigenación de la leghemoglobina en los nódulos de soja.



En los nódulos funcionales, la leghemoglobina activa parece estar exclusivamente en forma ferrosa (Appleby, 1969), por lo que el grupo hemo debe ser mantenido en forma reducida. Esto se consigue a través de una ferrileghemoglobina-reductasa, dependiente del NADPH, que ha sido detectada en nódulos. La actividad del enzima es alta durante el periodo de máxima fijación de nitrógeno que coincide cuando

el contenido de leghemoglobina es más elevado. En cambio su actividad, en nódulos inactivos, fue menor (Bashirova et al., 1978).

La leghemoglobina es una hemoproteína monomérica de PM entre 15.000 y 17.000 daltons que puede llegar a constituir el 10 % de las proteínas de la fracción vegetal de los nódulos de leguminosas (Bergersen, 1978). Hay evidencias que indican que el grupo hemo, una protoporfirina IX como grupo prostético de la proteína, es sintetizado por el bacteroide (Appleby, 1974), mientras que la apoproteína de la Lb, la globina, es sintetizada por la planta hospedadora - aunque el lugar y los factores que intervienen en la unión, de ambos componentes, para formar la leghemoglobina funcional, no se conoce.

La leghemoglobina como proteína soluble se localiza dentro de los tejidos centrales del nódulo que contienen los bacteroides (Smith, 1949). Sin embargo, la localización intracelular es bastante controvertida. En estudios con hierro marcado, Dilworth y Kidby (1968) utilizando ^{59}Fe en secciones de nódulos, concluyeron que la leghemoglobina - ^{59}Fe , se localiza entre la superficie del bacteroide y la membrana que lo envuelve, es decir en el espacio peribacteroide. En contraste con esto, Dart y Chandler (1971), demostraron que la leghemoglobina de los nódulos de distintas leguminosas se localiza en el citoplasma de las células infectadas. Bergersen y Goodchild (1973a), para solucionar las discrepancias estudiaron el tema, determinando que la mayor parte de la leghemoglobina se encuentra dentro de la envoltura membranosa de los bacteroides, a una concentración de 1,5 mM, en el periodo de máxima fijación de nitrógeno. Conclusiones semejantes se obtuvieron con guisante y con trébol blanco (Gourret y Fernández-Arias, 1974). Posteriormente, la controversia fue de nuevo abierta por Verma y Bal (1976), quienes utilizando técnicas inmunológicas, demostraron que se localiza en el citoplasma de la célula hospedadora, rodean-

do a las membranas envolventes del bacteroide. Sin embargo, estos resultados fueron muy criticados por Goodchild (1977).

Las diferencias entre estos informes pueden ser debidas a las diferentes técnicas utilizadas para la fijación del tejido. La investigación encaminada a conocer la localización intracelular de la leghemoglobina ha continuado. Cuando se aislaron bacteroides de nódulos de altramuz y soja rodeados de la membrana peribacteroide intacta, no se encontró, leghemoglobina asociada a la membrana que envuelve a los bacteroides (Verma et al., 1978). En este sentido, Bergersen y Appleby (1981), también aislaron bacteroides con la membrana envolvente intacta y sugirieron que hay dos sitios de localización de la leghemoglobina, encontrándose en el citoplasma, alrededor de los sacos, en una concentración 10 veces superior que en el espacio peribacteroideo.

Clásicamente se ha descrito que la leghemoglobina del nódulo, se une al oxígeno para evitar que interfiera en el proceso de fijación de nitrógeno. Esto no es exactamente cierto y puede conducir a ideas erróneas. Es cierto, que la concentración de oxígeno libre en los tejidos del nódulo, determinada por oxigenación de la leghemoglobina o utilizando un microelectrodo de oxígeno (Tjepkema y Yocum, 1974), es relativamente baja. Esto puede ser debido a la gran demanda de oxígeno que exigen las numerosas bacterias presentes en cada célula infectada del nódulo y a la difusión restrictiva del oxígeno a los sitios de consumo, considerándose que la mayor resistencia se encuentra en la zona interna de la corteza radical. Se ha demostrado que cuando la unión del oxígeno a la leghemoglobina se bloquea por el CO, el flujo de oxígeno al bacteroide y la actividad nitrogenasa disminuyen. Por tanto, sería más correcto afirmar que "bajo condiciones restrictivas en el suministro de oxígeno al bacteroide, dentro de las células del nódulo, la presencia de leghemoglobina asegura un adecuado flujo de oxígeno para mantener una adecuada fijación de nitrógeno".

Se han sugerido dos funciones para la leghemoglobina, facilitar la difusión del oxígeno libre a través de la membrana que rodea al bacteroide y actuar como filtro de oxígeno que permita mantener una correcta concentración del mismo en la superficie del bacteroide para soportar la síntesis de ATP y la actividad nitrogenasa.

Se asume que el ATP necesario para la nitrogenasa, en el bacteroide, es producido por la fosforilación oxidativa (Bergersen, 1978). Los bacteroides tienen dos sistemas oxidasa terminales con diferentes afinidades por el oxígeno (Appleby *et al.*, 1981). Se ha propuesto que uno de estos sistemas, el de alta afinidad, produce ATP eficientemente a bajas concentraciones de oxígeno (0.01-0.1 μM) mientras que el otro, el sistema de baja afinidad, opera a concentraciones de oxígeno superiores (1-10 μM) y produce ATP menos eficientemente. La leghemoglobina va a facilitar la difusión translacional del oxígeno, a los bacteroides, a una velocidad suficiente para mantener una anaerobiosis que no inhiba la fijación de nitrógeno. La concentración de oxígeno ligado a la leghemoglobina, es de 10.000 a 100.000 veces mayor que la del oxígeno libre, por lo que la oxileghemoglobina difunde a través de un gradiente muy acusado de oxigenación. Dicho gradiente se establecería entre la membrana plasmática de las células infectadas y las membranas peribacteroideas. El paso del oxígeno desde aquí hasta el bacteroide, implica la difusión como oxígeno libre a través de la membrana peribacteroidea, espacio peribacteroide, membrana envolvente externa del bacteroide, y espacio periplásmico, hasta el sistema citocromo en la membrana envolvente interna del bacteroide, (Robertson *et al.*, 1978).

La leghemoglobina se encuentra en todos los nódulos efectivos de las leguminosas y su nivel sigue el mismo perfil que la actividad nitrogenasa en los bacteroides (Bisseling *et al.*, 1978). Por tanto, su concentración puede estar relacionada, en cada momento, con el grado de actividad del

nódulo, habiéndose utilizado en algún caso como índice de la fijación de nitrógeno.

La senescencia del nódulo se observa por una pérdida del color rosado y la adquisición de un color marrón verdoso, debido a los productos de degradación del grupo hemo de la leghemoglobina. Esta senescencia, medida como disminución de la leghemoglobina, se acelera con la adición de nitrógeno combinado al medio de cultivo (Chen y Phillips, 1977).

2.5.3.- Metabolismo del Hidrógeno : Sistemas Hidrogenasa

Ya en 1956 Wilson y col. (Shug et al., 1956) determinaron que la fijación de nitrógeno y el metabolismo del hidrógeno, en los nódulos de las leguminosas, están relacionados. Esta relación permaneció oscura hasta que se demostró, que los extractos de Azotobacter producían una liberación de hidrógeno dependiente del poder reductor y del ATP, concomitante con la fijación de nitrógeno (Bulen y Lecomte, 1966). Posteriormente fue Dixon (1972) quien contribuyó al esclarecimiento de la relación entre la nitrogenasa y la hidrogenasa. En la actualidad este interesante tema ha sido puntualizado, en nódulos de leguminosas (Dixon, 1978; Evans et al., 1982), en algas verde-azuladas (Bothe y Eisbrenner, 1981) y en Azotobacter (Yates et al., 1981).

Los primeros indicios de que la nitrogenasa libera hidrógeno "in vivo", fueron obtenidos en nódulos de raíces de leguminosas (Hoch et al., 1957). Los intentos para demostrar un desprendimiento de hidrógeno similar en bacterias fijadoras, de vida libre, no tuvieron éxito (Burns y Hardy, 1975). Sin embargo, Schubert y Evans (1976) mostraron, que varias especies de leguminosas noduladas desprendían hidrógeno, consumiendo el 40 - 60 % de la energía disponible para la nitrogenasa. Cada molécula de hidrógeno producido,

requiere la transferencia de dos electrones y la hidrólisis de 4 moles de ATP, por tanto esta reacción colateral de la nitrogenasa representa una pérdida de rendimiento para los sistemas fijadores de nitrógeno, por malgastarse un alto porcentaje de energía.

Dixon (1972) fue el primero en observar que los bacteroides de R. leguminosarum contenían 2 sistemas hidrogenasa independientes, uno estaba implicado en la captación de hidrógeno y el otro en su liberación. Es decir, funcionaban en sentido inverso, pero mientras uno era sensible al CO el otro no lo era. Un sistema cataliza la reacción $2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2$ (nitrogenasa), mientras el otro es un sistema unidireccional que actúa en la dirección $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+$. Esta última hidrogenasa asociada a los bacteroides exhibe propiedades similares al complejo particulado hidrogenasa del A. croococum (Van der Werf y Yates, 1978). El sistema unidireccional presenta las siguientes ventajas :

a) La oxidación de hidrógeno puede utilizar el oxígeno y contribuir al mantenimiento de la nitrogenasa, sensible al O_2 , en un ambiente anaerobio. Aumenta la protección respiratoria.

b) La utilización del H_2 evita su acumulación a concentraciones que pueden inhibir la nitrogenasa.

c) La oxidación del hidrógeno por el complejo hidrogenasa permite un reciclaje de la energía gastada (ATP), en la reducción de los protones, por el sistema nitrogenasa-hidrogenasa.

Se ha determinado que la hidrogenasa de diversos sistemas fijadores de nitrógeno es un sistema enzimático unido a membranas (Van der Werf y Yates, 1978; Arp y Burris, 1982) que requiere específicamente níquel para la actividad (Friedrich et al., 1981), ya que forma parte del sitio activo del enzima.

En la vía de oxidación del hidrógeno, que Eisbrenner y Evans (1983) proponen, el oxígeno es el aceptor final de electrones aunque no reacciona directamente con la hidrogenasa sino que los electrones del hidrógeno se transfieren a través de una serie de transportadores al oxígeno. El primer aceptor de los electrones procedentes de la hidrogenasa es el componente 555, un citocromo b detectado por Eisbrenner et al. (1982 b). Los electrones entran posteriormente, en la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona (Eisbrenner et al., 1982 c). La cadena respiratoria está implicada en la oxidación del hidrógeno, esto está apoyado, por las experiencias realizadas con inhibidores respiratorios (Eisbrenner et al., 1982a) y por la generación de ATP durante la oxidación (Peterson y Burris, 1978).

La estequiometría de la oxidación del hidrógeno sugerida por Dixon (1978) implica que la oxidación de 2 moléculas de H_2 consumen una de O_2 , produce 2 moléculas de H_2O y genera 4 moléculas de ATP. Sin embargo, los efectos beneficiosos en cuanto a protección de la nitrogenasa frente al oxígeno o al hidrógeno, no pueden ser cuantitativamente estimados en la actualidad.

La actividad hidrogenasa inicialmente fue detectada en Rhizobium japonicum en vida libre (Maier et al., 1978). Sin embargo, la identificación de las razas de Rhizobium que forman nódulos que reciclen eficientemente el hidrógeno producido, durante la fijación de nitrógeno, es un tema que ha apasionado a numerosos investigadores (Evans et al., 1978; Ruiz-Argüeso et al., 1978; Bethlenfalvay y Phillips, 1979). Este sistema de reciclamiento de hidrógeno se ha detectado en bacteroides de Rhizobium leguminosarum, (Dejong et al., 1982), de Rhizobium japonicum (Lepo et al., 1981) y en el grupo cowpea (Pahiwa y Dogra, 1981). También los sistemas nodulares, formados por Frankia y no leguminosas, poseen un sistema eficaz de absorción de hidrógeno (Schubert y Evans, 1976).

Aparentemente la mayor parte de las leguminosas - agrícolas pierden una considerable proporción de energía en forma de hidrógeno desprendido. Este es un hecho que debe - ser mejorado puesto que el suministro de energía para la fi - jación de nitrógeno en los nódulos de leguminosas ha sido considerado como un factor limitante. Schubert y Evans (1976) examinaron diversas leguminosas para conocer la magnitud de la liberación de hidrógeno en la simbiosis y establecieron la llamada eficiencia relativa (ER) de los nódulos fijado - res de nitrógeno. Para el cálculo hay que tener en cuenta , que el poder energético y reductor suministrado por el foto - sintato se reparte entre la reducción de nitrógeno y la li - beración de hidrógeno que ocurre simultáneamente. La ER se puede expresar mediante la ecuación :

$$E R = 1 - \frac{H_2 \text{ desprendido en aire}}{H_2 \text{ desprendido en aire libre de } N_2}$$

En experimentos de invernadero, con soja, inocula - dos con razas de Rhizobium japonicum, Hup⁺ y Hup⁻ se compro - bó que las plantas inoculadas con las razas hidrogenasa po - sitiva, Hup⁺, mostraban un incremento de cosecha y del con - tenido de nitrógeno estadísticamente significativo respecto a las plantas inoculadas con razas hidrogenasa negativa, Hup⁻, (Schubert et al., 1978). Otros experimentos semejantes rea - lizados en el campo han mostrado similares resultados (Lepo et al., 1981). Sin embargo, la importancia práctica de pre - sencia de hidrogenasa en algunas razas de Rhizobium está - siendo cuestionada por numerosos experimentos con resultados contradictorios.

A pesar de lo anteriormente expuesto, no podemos - olvidar que el hecho de que algunas razas de Rhizobium hayan evolucionado adquiriendo un sistema de absorción de hidróge - no, sin haber perdido la capacidad de generar hidrógeno, su - guiere que la producción de hidrógeno por la nitrogenasa, es una primitiva y posiblemente inevitable función.

2.5.4.- Interrelación entre Fotosíntesis y Fijación de Nitrógeno.

El proceso fotosintético y la fijación biológica de nitrógeno están íntimamente relacionados, esta interdependencia mutua, ha sido repetidamente puesta de manifiesto (Minchin y Pate, 1974 ; Bethlenfalway y Phillips, 1978 ; Bedmar y Olivares, 1982).

El fotosintato suministrado a los nódulos se utiliza para : a) generar potencial de reducción y ATP para el sistema nitrogenasa; b) mantener el metabolismo citoplasmático de la célula huésped; c) suministrar esqueletos carbonados, poder energético y reductor, para la síntesis de asimilados nitrogenados que serán exportados selectivamente, a las zonas de crecimiento de la planta, vía xilema.

La sacarosa procedente de los fotoasimilados se considera fuente primaria de carbono para los nódulos (Pate, 1962), siendo el producto carbonado que se transporta mayoritariamente desde las hojas hasta los nódulos. En los nódulos puede llevarse a cabo su metabolización aunque hay autores que describen la presencia de sacarosa en las raíces pero no en los nódulos, en ellos, los principales azúcares serían la glucosa y la fructosa (Lawrie y Wheeler, 1975).

La opinión más generalizada es que la sacarosa que llega desde el floema es metabolizada por una invertasa en el citoplasma de las células hospedadoras, produciendo hexosas, cuyo catabolismo en el bacteroide no ha sido investigado con detalle. Además de las hexosas, los bacteroides reciben de la planta, ácidos orgánicos como sustratos carbonados (Ronson y Primrose, 1979).

Otros compuestos carbonados de reserva han sido encontrados en los nódulos. En el citoplasma de las células infectadas se ha detectado un bajo nivel de almidón, que sin embargo abunda en las células no infectadas del nódulo, las

cuales muestran gran cantidad de plasmodios en la pared - que conecta con la célula infectada (Bergersen y Goodchild, 1973 a; Werner y Mörschel, 1978). Este almidón puede ser utilizado para la fijación de nitrógeno, bajo condiciones de fotosíntesis limitante. En los bacteroides de algunas leguminosas se ha detectado poli- β -hidroxibutirato, como reserva carbonada (Werner y Mörschel, 1978), cuya función podría ser suministrar el sustrato necesario para soportar la fijación de nitrógeno en los periodos de oscuridad.

Se ha observado que tanto la fijación de nitrógeno como el transporte de fotosintato al nódulo siguen un ritmo diario, siendo mayor durante el día que durante la noche (Minchin y Pate, 1974). En ocasiones estas variaciones diarias, no se han visto y ello es debido a la existencia de "pools" de reservas carbonadas que pueden ser utilizadas en condiciones de fotosíntesis limitante.

La actividad nitrogenasa de los nódulos de soja disminuye cuando la planta se dispone en la oscuridad o se eliminan las hojas (Trang y Gidden, 1980). Wong y Evans (1971), interpretan esta reducción de la fijación de nitrógeno como una inhibición "feed back" de la síntesis de la nitrogenasa por los iones amonio que no son asimilados por falta de esqueletos carbonados. Sin embargo, Ching et al. (1975) atribuyen a una falta de potencial reductor y disminución de la carga energética.

Clásicamente todos aquellos factores que elevan la producción de fotosintato, producen efectos similares en la fijación de nitrógeno. Factores como, el incremento de la intensidad de la luz (Sloger et al., 1975), injertos de sistemas caulinares en las raíces noduladas (Streeter, 1974) baja densidad de siembra (Sprent y Bradford, 1977), atmósferas enriquecidas de CO_2 (Wilson et al., 1933) e inhibición de la fotorrespiración (Bedmar y Olivares, 1980), que contribuyen a aumentar la tasa fotosintética, también mejoran la fijación de nitrógeno. En cambio factores como el stress hí

drico (Sprent, 1971) alta densidad de siembra (Sprent y Bradford, 1977) entre otros, disminuyen el fotosintato al nódulo con el consiguiente descenso de la fijación de nitrógeno.

Las plantas formadoras de nódulos fijadores de nitrógeno requieren que se desvíe al nódulo un nivel de fotosintato relevante. Minchin y Pate (1974), establecen que de 100 unidades de carbono fijado fotosintéticamente 32 son transportadas al nódulo, de las cuales 5 se consumen en el crecimiento del nódulo, 12 unidades se pierden en el proceso de respiración y 15 se utilizan en la producción y exportación de compuestos nitrogenados procedentes de la fijación. Minchin et al. (1981), señalan que los nódulos de distintas leguminosas requieren entre 1.1 y 7.6 g de carbono por cada gramo de nitrógeno fijado. Esto nos indica el alto coste energético de la fijación de nitrógeno, en comparación con otros procesos biológicos.

Todos estos datos han sido obtenidos en estudios realizados en ambientes controlados, no conociéndose el significado real del coste energético de la fijación de nitrógeno en cultivos agrícolas. Actualmente no hay datos disponibles que permitan establecer diferencias en el uso del carbono, en la fijación de nitrógeno, que se traduzca en variaciones en el rendimiento económico de las cosechas de leguminosas cultivadas.

2.6.- Hormonas en la Fijación de Nitrógeno.

La compleja interacción entre raíces de plantas superiores y los organismos procarióticos, cuyo resultado es la formación de nódulos radicales fijadores de nitrógeno, exige una gran coordinación en cuanto a la información genética y en la producción y redistribución de energía y metabolitos intermediarios entre los dos organismos. Los nódulos, son estructuras altamente organizadas y metabólicamente muy

activos. Por tanto, parece probable que el proceso de la nodulación y fijación de nitrógeno, esté controlado por las fitohormonas, producidas tanto por la planta como por las bacterias, en orden a mantener el grado de organización, expresión génica, metabolismo e integridad celular necesarios para llevar a cabo el proceso de asimilación del nitrógeno atmosférico.

La participación de los factores hormonales en la implantación del nódulo en raíces de leguminosas infectadas por su Rhizobium específico, es un tema de interés singular sobre el que existen muchas hipótesis, si bien, la función específica y clara de las fitohormonas en el proceso no está aún aclarada.

Nutman (1952) observó, una inhibición de la nodulación cuando se eliminaban los ápices de la raíz en Trifolium subterraneum. Esto sugiere que un factor, producido por la raíz, controla el posterior desarrollo de los nódulos mostrando este hecho unas características frecuentemente asociadas con las hormonas vegetales. Para estudiar el posible papel de las fitohormonas en la nodulación, se ha estudiado el nivel de hormonas en el nódulo y el efecto de distintas hormonas, suministradas exogenamente, en el desarrollo del nódulo. Las conclusiones obtenidas no son satisfactorias, puesto que no está claro el papel de los reguladores del crecimiento en algún aspecto concreto de la nodulación y fijación de nitrógeno.

Se han encontrado niveles altos de sustancias promotoras del crecimiento en los nódulos de guisantes y judías (Pate, 1958 ; Radley, 1961), mientras que los inhibidores del crecimiento pueden ser detectados en las etapas tardías del desarrollo del nódulo (Pate, 1958).

Entre todas las hormonas vegetales, la auxina sintetizada por la especie bacteriana (Torrey, 1976; Saric et al., 1978) o por la planta huésped (Dixon, 1969), es la hormona cuya implicación en este proceso ha sido ampliamente -

descrita, aunque no hay unanimidad en las hipótesis. El ácido indol acético ha sido detectado en altas concentraciones en nódulos de *Lupinus juteus* y de *Alnus glutinosa*, mientras que las raíces de las mismas plantas lo contienen en bajas concentraciones (Dullaart, 1970). En la iniciación del nódulo lo podría estar implicado el AIA posiblemente producido por la bacteria en el filamento de infección.

Existen diversas opiniones a favor de su intervención en los primeros momentos de la infección (Kefford et al., 1960 ; Key et al., 1967).

Algunos autores indican que la auxina, aún a distintas concentraciones, induce la deformación del pelo radical pero no el "curling" característico del inicio de la infección (Bergersen, 1978).

El alto grado de organización del nódulo indica que además deben estar involucrados otros reguladores como citoquininas, giberelinas y etileno (Sequeira, 1973). Altas concentraciones de auxinas y citoquininas inhiben el desarrollo del nódulo en *Trifolium subterraneum* y en *Phaseolus vulgaris* mientras que bajas concentraciones no le afectan, sin embargo la antiauxina (α - 4 - ácido clorofenoxi butírico), aumentó el número de nódulos de ambas especies (Cartwright, 1967). Sequeira (1973), arguye que la anormal respuesta de crecimiento asociada con la infección de la raíz por algún microorganismo tal como *Rhizobium* puede ser explicada por un incremento en la síntesis de auxina junto con la inhibición de la AIA oxidasa. De hecho, el nivel de AIA en los nódulos puede estar relacionado con el nivel de AIA oxidasa, ya que Mennes (1973), observó que los nódulos contenían niveles más bajos de AIA oxidasa que los tejidos radicales - próximos al nódulo.

Por otra parte, Puppo y Rigaud (1975) "in vitro", determinaron que la leghemoglobina promueve la oxidación del AIA pero se desconoce el significado de este hecho como un control de nivel de AIA "in vivo".

El efecto que las auxinas exógenas y otros reguladores ejercen en el crecimiento de especies de Rhizobium, de raíces de plantas y en la formación del nódulo ha sido estudiado por varios autores (Nutman, 1952; Abeles, 1973), observándose efectos inhibidores y promotores dependiendo de la concentración de la hormona.

Entre las hormonas producidas por las bacterias que infectan los sistemas radicales están las giberelinas (Saric et al., 1978; Radley, 1961). Las sustancias giberelínicas - producidas por diferentes estirpes de Rhizobium pueden intervenir en la multiplicación de los microorganismos del suelo, en la alteración de procesos químicos del suelo y en el desarrollo del meristemo nodular (Evensen et al., 1981). Las giberelinas, consideradas como estimuladoras del crecimiento, al ser sintetizadas en los nódulos de las leguminosas - (Dullaart, 1970), podrían incluso afectar a la fijación de nitrógeno (Saric et al., 1978; 1981). Se ha puesto de manifiesto que la secreción de sustancias giberelínicas por las bacterias y ápices de la raíz, estimulan la nodulación (Dixon, 1969).

Las giberelinas aplicadas exógenamente a las plantas pueden disminuir la nodulación (Radley, 1961). Al tratar las hojas de guisantes enanos con giberelinas se observó una disminución de la formación de nódulos (Kefford et al., 1960) aunque el mismo tratamiento no afectó a la nodulación en Trifolium repens (Fletcher et al., 1958). De forma similar cuando las giberelinas se adicionan al medio de cultivo, se inhibe la nodulación en las raíces de Trifolium subterraneum (Kefford et al., 1960) y en Phaseolus vulgaris (Cartwright, 1967), pero la concentración fue importante, puesto que Kefford et al. (1960) observaron que bajas concentraciones, alrededor de 10^{-8} M, no afectaban la nodulación. También pueden intervenir en el grado de infectividad de la bacteria, ya que aquellas bacterias que producen giberelinas en las primeras 72 horas del cultivo, son los que

muestran un mayor grado de formación de nódulos (Lluch et al., 1983).

Las citoquininas están presentes en el ápice de la raíz y pueden ser transportadas basipétalmente en las raíces (Mozes y Altman, 1977). Torrey (1976), establece que el posible papel de las citoquininas originadas en el ápice radical está relacionado con la inhibición del inicio de las raíces laterales. Las citoquininas se producen en cultivos de especies de Rhizobium en cantidades suficientes como para producir mitosis poliploides típicas de los meristemas nodulares (Phillips y Torrey, 1970; Torrey, 1976). La hipótesis más ampliamente aceptada sostiene la participación de las citoquininas, junto con las auxinas, en la infección de la zona meristemática y aparición de las células disomáticas que formarán el tejido infectado del nódulo (Pankhurst y Schwinghamer, 1974). Sin embargo, no se ha observado su intervención en el filamento de infección.

Entre las funciones que se le asignan a las citoquininas, producidas por Rhizobium, está la de intervenir en los primeros momentos de la diferenciación del nódulo (Phillips y Torrey, 1970). Otras sustancias con actividad citoquinina, como la isopentenil adenina o su ribósido, detectada en nódulos de Phaseolus, parecen jugar un papel importante durante la vida del nódulo, desde su inicio hasta su madurez. (Puppo et al., 1974). En cualquier caso su acción, debe estar relacionada con la de otras sustancias de crecimiento.

El etileno es sintetizado por muchas especies de bacterias y hongos del suelo. Agronómicamente, esta producción de etileno puede ser significativa puesto que es una hormona vegetal que interviene en numerosos procesos del crecimiento y desarrollo de la planta (Pratt y Goeschl, 1969 ; Leopold y Kriedeman, 1978).

El etileno, hormona gaseosa vegetal, es producida en pequeñas concentraciones por los distintos órganos de la planta. El etileno es producido por las raíces en cantidades suficientes para ser fisiológicamente importante (Radin y Loomis, 1969). Cuando el etileno lo producen las raíces de las plantas es probable que altere la microflora del suelo sensible a este gas, incluso las raíces pueden verse afectadas por el etileno, especialmente en suelos donde la difusión gaseosa está dificultada. El etileno actúa como -inhibidor, de la elongación radical, de la iniciación de raíces laterales y de la actividad cambial (Leopold y Kriedeman, 1978). El efecto contrario observado por el dióxido de carbono, es debido a la interacción con el etileno endógeno radical (Radin y Loomis, 1969). El dióxido de carbono actúa como un inhibidor competitivo en el mecanismo de acción del etileno (Beyer et al., 1979).

La aplicación de auxinas a la raíz produce una inhibición de su elongación. Chadwich y Burg (1970) presentan evidencias que sugieren que, en gran medida, la inhibición del crecimiento radical inducido por la auxina en ápices de raíces escindidas y virtualmente en raíces intactas es el resultado de una producción de etileno dependiente -del AIA. Hay datos que demuestran que existe una marcada diferencia entre los efectos de la adición de AIA y del etileno en el crecimiento de la raíz. Sin embargo el hecho de que altos niveles de etileno no son tan efectivos en la inhibición de la raíz como bajos niveles de AIA sugiere que la inhibición de la auxina no está completamente mediada -por el etileno (Rauser y Horton, 1975). Posteriormente Frenkel et al. (1975) informan que el inicio de la liberación de etileno estaba asociado con la degradación oxidativa de la auxina, por lo que la auxina será un retardador de la senescencia y los oxindoles, productos de su oxidación, promotores de la misma. Sin embargo Lau et al. (1978) demuestran que la producción de etileno estimulada por la auxina no está mediada por sus productos de oxidación.

Pocos informes existen sobre la influencia que esta hormona gaseosa ejerce sobre la nodulación en raíces de leguminosas, los primeros se obtienen al estudiar la influencia de los factores ambientales en el crecimiento y nodulación de raíces de judías escindidas (Small et al., 1968). Estos sospecharon que las raíces producían etileno y que la acumulación de este gas en sistemas cerrados podría prevenir la nodulación. Efectivamente se comprobó que concentraciones de 8 ppm de etileno inhibían la nodulación totalmente y concentraciones de 0,4 ppm disminuían la nodulación a valores mínimos (Grobbelaar et al., 1970; 1971). Esta influencia negativa del etileno en la nodulación y la normal producción del etileno por las raíces de leguminosas (Goodlass et al., 1979), son dos aspectos importantes de la simbiosis Rhizobium - Leguminosa cuya relación o interacción es poco conocida.

Se ha observado que el nivel de etileno desprendido por las raíces noduladas de Medicago sativa es mucho mayor que el liberado por las raíces cuando la planta crece en presencia de nitrógeno combinado y no está inoculada. También se puso de manifiesto que la longitud y el peso seco de la raíz nodulada fue menor que el de la raíz no nodulada. Un hecho interesante fue que los picos de etileno detectados, coincidían con determinados estadios morfogénéticos de los nódulos (Lígero et al., 1981a).

Cuando el azufre es adicionado al cultivo puede incrementar el contenido en metionina, aminoácido azufrado, considerado como el precursor de la biosíntesis del etileno "in vivo" (Lieberman et al., 1966). Esta hipótesis parece estar apoyada por autores que han demostrado que los tratamientos de azufre y ethrel se comportan de forma similar (Recalde-Manrique y Recalde Martínez, 1979). El ethrel, ácido 2 Cl - etano fosfónico, compuesto que libera etileno, también afecta la nodulación. Drennan y Norton (1972) aplicaron ethrel a las raíces de guisantes inoculadas y observaron que

respecto al testigo las raíces laterales eran más pequeñas, así como todos los parámetros de la nodulación.

En experiencias con cultivos de leguminosas se observó que la liberación de etileno por las raíces de las plantas depende de la forma y cantidad de azufre aplicado y existe una correlación negativa entre la hormona liberada y el número de nódulos formados (Lluch et al., 1982).

Sin embargo, el mecanismo exacto es difícil de conocer y puede estar involucrado todo un proceso hormonal. Se ha sugerido que el etileno es un antagonista y modulador de hormonas promotoras del crecimiento. Parece probable que exista una relación entre la producción de etileno y el nivel de auxina endógena en distintos tejidos. Sobre el mecanismo se ha concluido que un cierto nivel de auxina, estimula el sistema enzimático que convierte la metionina en etileno pero no incrementa la formación de metionina.

3.- NUTRICION MINERAL DE LAS LEGUMINOSAS

Conocer la nutrición mineral de las leguminosas , así como sus aspectos bioquímicos, ha sido un tema por el cual se ha demostrado poco interés si se le compara con el conocimiento de la nutrición mineral en cereales (Shukla et al., 1983). En muchas ocasiones el rendimiento del cultivo, está restringido al uso de fertilizantes, es por ello que la cosecha y la calidad del cultivo puede ser mejorada con una adecuada fertilización mineral (Mengel y Kirkby, 1978), ésta se consigue proporcionando al cultivo aquellos elementos minerales esenciales que son la clave de su Nutrición Mineral.

En este apartado vamos a referirnos a los distin - tos nutrientes necesarios en los cultivos de leguminosas, abordando con especial interés la nutrición nitrogenada y azufrada.

3.1.- Composición Mineral de las Leguminosas.

El contenido de elementos minerales en distintas leguminosas ha sido estudiado por diversos autores (Beeson, 1941; Meiners et al., 1976; Lluch et al., 1976; Minchin et al., 1981).

Los elementos minerales considerados como macronutrientes, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre, entran a formar parte de las leguminosas en proporciones muy diversas. De forma somera se van a estudiar las características e importancia de estos elementos en las leguminosas.

Las leguminosas contienen una elevada cantidad de FOSFORO, principalmente como ácido fítico que se acumula en las semillas. Las leguminosas con grano responden a la fertilización fosfatada. Con la aplicación de fósforo se ha observado un incremento de cosecha en Glycine max (Kumar, 1978) en pisum sativum (Fageria, 1977) y en Vigna radiata (Aulakh y Pasricha, 1977). El suministro de fósforo favorece su absorción e incrementa el contenido de calcio, magnesio potasio y sodio aunque disminuye la concentración de hierro en distintos vegetales (Fageria, 1977). En Vigna radiata, la absorción de nitrógeno, fósforo y potasio se estimula con la fertilización fosfatada, la cantidad de magnesio queda constante y se encuentra una interacción antagónica entre el fósforo y el azufre en la absorción de ambos elementos, (Aulakh y Pasricha, 1977). Sin embargo, en soja, la fertilización fosfatada incrementa el contenido de fósforo, magnesio, hierro y azufre en las semillas (Kumar, 1978).

El fósforo juega un papel importante en la captación y transferencia de la energía y en la recuperación de los procesos bioquímicos y biofísicos. Como anión tetraoxi trivalente puede actuar como unidad de enlace (Epstein, 1972).

Las leguminosas también son muy ricas en CALCIO , elemento esencial en la nutrición de estos vegetales para la formación y desarrollo de la semilla. Los valores de calcio obtenidos en diferentes cultivos varían con las especies y depende de distintos factores: contenido mineral del suelo clima y métodos de cultivo (Rachie y Roberts, 1974), entre otros. El calcio es un elemento inmóvil, en las plantas, que se acumula en elevadas cantidades. Hay variedades de soja y guisante que contienen del orden de 200 mg de calcio/100 g de materia seca (Ohlrogge, 1960).

El calcio junto con el potasio va a influir en el mantenimiento de la organización celular, hidratación y permeabilidad de las membranas. Actúa como cofactor de algunas enzimas, como fosfolipasas, ATP-asas y junto con otros cationes contribuye al mantenimiento del balance iónico y osmótico de las plantas (Anderson y Cormier, 1978). También se ha observado que los iones Ca^{++} pueden interaccionar con las hormonas vegetales, participando así en sus acciones (Leopold y Kriedeman, 1978).

El POTASIO está presente en los tejidos vegetales como catión libre e intercambiable. Es el más móvil de los elementos esenciales. Funciona como activador de numerosas enzimas, e interviene, en los procesos de transporte a través de membranas, en el mantenimiento del potencial osmótico y en el proceso de neutralización de aniones (Suelter , 1970). Se transporta por el tallo hacia los órganos vegetativos y desde éstos puede transportarse hacia los órganos reproductores durante el desarrollo de la planta a través del floema. Los valores extremos de la concentración de potasio, determinado en leguminosas, oscilan entre 0,30 y 5,7 % (Ohlrogge, 1960).

El MAGNESIO forma parte de la clorofila y actúa como metal activador de diversos sistemas enzimáticos. El magnesio es un catión divalente fuertemente electropositivo , móvil y se puede coordinar con ligandos nucleofílicos me-

dante enlaces iónicos (Portis y Heldt, 1976). La concentración de magnesio en tejidos vegetales de leguminosas se sitúa en un rango comprendido entre 0,092 y 1,49 % (Ohlrogge 1960). La máxima absorción de magnesio se produce durante la floración, antes de que se formen las vainas. Durante el llenado de la vaina la absorción es menor y ello influye en el contenido de magnesio de la semilla. La absorción de magnesio durante el crecimiento vegetativo también es elevada, siendo las hojas el órgano que más elemento acumula (Webb et al., 1954).

La deficiencia de magnesio no afecta la absorción de fósforo, pero sí tiene un efecto significativo sobre su movimiento y localización final en la planta. Las semillas de estas plantas tienen un nivel de fósforo más bajo que las plantas normales, no deficientes. Por otra parte la deficiencia de Mg favorece el incremento de la absorción de otros cationes como el Ca y K, con el consiguiente desequilibrio nutritivo, para la planta (Ohlrogge, 1960).

EL NITROGENO y el AZUFRE, que en estado reducido se unen covalentemente a los constituyentes orgánicos de los vegetales, son los otros dos macronutrientes esenciales que intervienen en la composición de las leguminosas. La importancia de estos elementos en la nutrición mineral y en la fisiología de las leguminosas será abordada con más detalle, en otro apartado de esta revisión.

Otros elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, si bien la proporción en que entran a formar parte de la materia vegetal es en forma de trazas, son los denominados Micronutrientes: hierro, cobre, zinc, manganeso, boro, molibdeno y cobalto. El contenido de micronutrientes, en diferentes leguminosas, ha sido descrito en la bibliografía; (Meiners et al., 1976; Clarkson y Hanson, 1980; Shukla et al., 1983). La gran variación de los datos presentados en la bibliografía consultada es debida, sin duda, a la utilización de distintos métodos analíticos y a las diferentes condiciones de cultivo.

El HIERRO es constituyente de las proteínas hémicas y no hémicas involucradas en la fotosíntesis y en la fijación de nitrógeno. También interviene en procesos de oxidoreducción y en la activación de enzimas (Hewitt et al., 1976). En judías se ha observado que se transporta por el xilema y el floema a los órganos de crecimiento a través de la corriente de transpiración, sin embargo, el transporte depende del metabolismo de la raíz. El hierro puede ser absorbido en forma de quelatos y también puede formar quelatos, dentro de la planta, con el citrato, describiéndose esta opción como forma de transporte del hierro a través de la planta (Brown y Chaney, 1971). La concentración de hierro en leguminosas oscila entre 20 y 90 ppm (Ohlrogge, 1960).

El ZINC es un elemento que forma parte de distintos enzimas: superóxido dismutasa, anhidrasa carbónica, algunas polimerasas y deshidrogenasas (Vallee y Wacker, 1976). Las deficiencias de zinc pueden afectar la cantidad de nitrógeno en las leguminosas y el peso de los nódulos (Demeterio et al., 1972), sin embargo, el desarrollo del nódulo no se afecta. Es un elemento móvil y los límites de deficiencia y toxicidad para guisantes y judías se presentan por debajo de 20 ppm y por encima de 50 ppm de zinc respectivamente en hoja.

El MANGANESO se absorbe como catión y es un activador de enzimas, interviene en procesos de oxidoreducción y en el fotosistema II (Govindjee y Marks, 1978). El número de nódulos y la fijación de nitrógeno en leguminosas no se afecta con el manganeso, pero sí influencia la nitrato-reducción (Hewitt, 1970). En plantas con deficiencias en manganeso se observa que hay una acumulación de nitratos, debido a una pérdida de la actividad nitrato-reductasa.

El MOLIBDENO es un constituyente esencial de la enzima nitrogenasa y de la nitrato reductasa. Es por tanto, necesario para el proceso de fijación de nitrógeno y para

la reducción de nitratos (Stieffel, 1973). La importancia de este elemento en la fijación de nitrógeno y en el crecimiento de las leguminosas fue reconocida por primera vez por Bortels (1937). Este investigador observó que las leguminosas crecían mejor y contenían más nitrógeno cuando se aplicaban pequeñas cantidades de molibdeno. Se ha demostrado que las leguminosas tienen de 5 a 15 veces más molibdeno en los nódulos de sus raíces que en otras partes de la planta. Haggstrom y Berger (1963), encontraron que en ausencia de molibdeno las leguminosas fijaban poco nitrógeno. Es probable que las leguminosas que no tengan nódulos y que crezcan en un medio con nitrógeno combinado, como amonio, no requieran molibdeno.

Los síntomas de deficiencia son muy semejantes a los presentados por las plantas con carencias de nitrógeno, (Maynard, 1979).

El COBRE participa en los sistemas enzimáticos redox y es constituyente de la plastocianina. Es un elemento móvil y su movilidad depende del status de cobre en la planta. Loneragan (1975) propone que, puesto que el cobre tiene una gran afinidad por el átomo de nitrógeno de los aminoácidos, y que algunas formas aniónicas del cobre pueden formar complejos con los aminoácidos, ésta sería la forma de transporte del cobre en la planta. Las observaciones de Hallsworth et al., (1960) sugieren que son pocos los requerimientos específicos de cobre en la fijación simbiótica de nitrógeno. Sin embargo, hay autores que sugieren que este elemento está involucrado en la síntesis de la leghemoglobina (Hallsworth et al., 1960), mientras otros suponen que afecta a la actividad citocromo oxidasa terminal en los nódulos.

El BORO, como micronutriente, se ha encontrado que es esencial para la división celular normal, interviene en el transporte de los carbohidratos y flavonoides y en el mecanismo de acción del fitocromo (Tanada, 1978). Ohlrogge, (1960), informó que los niveles en las plantas oscilan en-

tre 10 y más de 2000 ppm, pero las concentraciones normales en distintas leguminosas oscilan entre 20 y 100 ppm.

El COBALTO es esencial para los microorganismos fijadores de nitrógeno en vida libre y en los nódulos de leguminosas (Kliewerd y Evans, 1962). Estos autores han observado que este elemento aumenta la fijación de nitrógeno en plantas de alfalfa noduladas y su ausencia afecta drásticamente al crecimiento de la soja. El cobalto como el Fe-hémico, puede formar un quelato con los cuatro átomos de nitrógeno centrales de una estructura porfirínica, este complejo de cobalto forma parte de un grupo prostético que asociado con un nucleótido forma parte de un coenzima denominado cobalamina o vitamina B₁₂. Sin embargo no se conoce cómo este coenzima puede afectar la fijación de nitrógeno, aunque se ha visto que la deficiencia de cobalto inhibe la formación de leghemoglobina y afecta el desarrollo del Rhizobium (Evans y Russell, 1971).

3.2.- Efecto de la Nutrición Mineral sobre la Calidad de las Leguminosas.

La riqueza proteica de las leguminosas, no sólo debe referirse a la cantidad, sino que también debe tener en cuenta la calidad de la misma. La calidad de una proteína, viene determinada por su composición en aminoácidos esenciales, balance de aminoácidos, disponibilidad biológica de los aminoácidos esenciales, digestibilidad, e interferencia de la utilización de la proteína con factores antinutricionales (Arora, 1983).

La cantidad de proteína puede aumentarse con la aplicación de nitrógeno y fósforo, solo o en combinación con el potasio y disminuir bajo condiciones de deficiencias de nitrógeno, fósforo, azufre y magnesio (Klein y Jager, 1978).

La deficiencia de calcio y potasio no afecta al contenido de proteína, en cambio una deficiencia de azufre se traduce en una menor cantidad de proteína en Cicer arietinum, Arachis hypogea y Pisum sativum respecto a las plantas que crecen, con un adecuado suministro de este elemento (Dube y Misra, 1970).

En un intento de evaluar la calidad de la proteína se ha estudiado la composición en aminoácidos de las proteínas de diversas leguminosas. En general son deficientes en aminoácidos azufrados y en triptófano, pero son ricas en lisina, aminoácido que no se encuentra en la proteína de los cereales. Estos datos se han obtenido por comparación con los de la proteína de huevo o con la referencia dada por la FAO (1957). Se ha observado que las proteínas de gran cantidad de leguminosas son deficientes en metionina y en triptófano (Kapoor y Gupta, 1977; Gupta et al., 1978). Sin embargo, los estudios de Arora y Luthra (1970) revelaron que niveles de azufre superiores a 90 ppm, aumentaban los aminoácidos azufrados en judía. Resultados similares se observaron para guisantes (Rao y Das, 1967).

La nutrición mineral también afecta al contenido en lípidos de las leguminosas oleaginosas como la soja y el cacahuate. La aplicación de altos niveles de nitrógeno, solo o conjuntamente con potasio, disminuye el contenido de lípidos en algunas leguminosas, mientras que aumentan con la aplicación de azufre. Además pueden influir en la oxidación y alteración de los ácidos grasos contribuyendo a cambios no deseados en los alimentos, como son la pérdida de calidad nutritiva y aromática (Salunkhe et al., 1983).

Los elementos minerales se asocian con las proteínas de las plantas y de alguna ~~manera~~ regulan la actividad de numerosos enzimas relacionados con la asimilación del nitrógeno y con el metabolismo en general (Klein y Jager, 1978; Shukla et al., 1983).

En las leguminosas, el proceso de la fijación de nitrógeno depende en muchos aspectos del metabolismo de la planta hospedadora; por tanto no cabe duda que una correcta y equilibrada nutrición mineral de la planta, contribuirá a mejorar la fijación biológica del nitrógeno, en la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

3.3.- Nutrición Nitrogenada.

El rendimiento de los cultivos está limitado en la agricultura por severas deficiencias de, por lo menos, algunos de los nutrientes principales, en aquellas regiones del mundo más superpobladas (Greenwood, 1980). La respuesta de los cultivos a la fertilización es en general apreciable, tanto que el rendimiento del cultivo es casi proporcional a las cantidades de N + P + K, suministrados como fertilizantes en los principales países agrícolas. Frecuentemente las respuestas a los fertilizantes nitrogenados se ven limitadas por deficiencias de otros nutrientes y a menos que se rectifiquen estas deficiencias (Richards, 1979; von Peter, 1980), no se observan incrementos apreciables en la cosecha. Sin embargo, si los suelos están bien dotados de fósforo, potasio y azufre, el rendimiento promedio del cultivo es casi directamente proporcional a los niveles de nitrógeno aplicado.

El nitrógeno es probablemente el nutriente mineral de las plantas, mejor estudiado y es absorbido por éstas en una gran proporción. Puede entrar en la planta, por diferentes vías y en distintas formas. Sin embargo, su disponibilidad depende del nivel de fertilizantes nitrogenados y de las bacterias del ciclo del nitrógeno que pueden colaborar en la descomposición de la materia orgánica.

El nitrógeno es constituyente importante de las proteínas, además se encuentra en los nucleótidos (ácidos nu

cleicos, moléculas energéticas) y numerosos metabolitos intermedarios. Generalmente en el vegetal se encuentra en una proporción que oscila entre 1,5 al 5 % del peso seco. Una pequeña cantidad de nitrógeno puede estar en forma soluble, como nitrato o como aminoácidos libres, representando esta forma soluble de nitrógeno, bajo condiciones normales, una fracción muy pequeña (Mills y Jones, 1979).

Las plantas son los organismos, por excelencia, que transforman las formas inorgánicas de nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+) principalmente, en N orgánico.

3.3.1.- Absorción.

El nitrógeno entra en la planta por la raíz o a través de las hojas, en forma de nitratos o en forma de amonio, ambas pueden ser metabolizadas por las plantas.

En general existe una gran absorción de nitratos y de las investigaciones de Ansari y Bowling (1972), se deduce que la absorción de nitratos ocurre en contra de un gradiente electroquímico indicando que es una absorción activa. El nitrato presente en la raíz puede intercambiarse con el nitrato de la solución del suelo, considerándose que el flujo de nitratos es pasivo y la absorción es activa. Otras evidencias del control metabólico de la absorción de nitratos las suministran Rao y Rains (1976).

Sin embargo, si la absorción de amonio por las plantas es un proceso activo, es una cuestión abierta en la actualidad, Zsoldos (1972) indica que la absorción de ambas formas de nitrógeno se afecta con la temperatura. En cambio Clarkson y Warner (1979), concluyen que cuando se suministran los dos iones en igual concentración, el amonio se absorbe más rápidamente que el nitrato a temperaturas bajas. El porqué se absorbe el amonio más rápidamente a temperaturas bajas no se sabe. Estos mismos autores sugieren que pue

de ser atribuido a cambios físicos en las membranas. Hay algunos indicios que señalan que el nitrógeno amónico es absorbido en forma de amoniaco y como molécula neutra que es, Moore (1974) sugiere que puede atravesar fácilmente las membranas celulares.

La absorción de ambos iones está influenciada, por el pH del medio, a pH ácidos o neutros se absorbe mejor el nitrato y a pH altos se absorbe mejor el amonio (Rao y Rains, 1976) y por el status de carbohidratos en las plantas, cuando este nivel es alto se favorece la absorción de amonio (Kirkby y Hughes, 1970).

También puede presentarse una competencia entre ambas formas de nitrógeno en la absorción (Blondel y Blanc, 1974). Cuando ambos iones están presentes, el amonio actúa como un inhibidor de la absorción de nitratos (Rao y Rains, 1976).

Sin embargo la mayor absorción de nitrógeno fue observada por Blondel y Blanc (1974) cuando ambas formas de nitrógeno estaban en la solución de cultivo. El efecto positivo de la combinación de ambas formas de nitrógeno en el crecimiento de la planta necesita ser estudiado profundamente (Clement *et al.*, 1978).

3.3.2.- Transporte y Acumulación de Nitrógeno.

La principal vía de transporte a larga distancia, de los solutos nitrogenados absorbidos por la raíz en plantas vasculares, es el flujo de masas a través del xilema hasta la zona de transpiración en la parte aérea (Pate, 1980). Es frecuente que la mayor parte de los compuestos transportados por el xilema sean nitrogenados, mientras que el floema transporta carbohidratos, de hecho, el nivel de este elemento en el xilema es del orden del 0.01 - 0,21% (P/V) mientras que en el floema es la décima parte de la anterior (Pa-

te et al., 1975; Pate, 1976b). La relación C/N en el xilema, es del orden de 1.5 a 6, indicando ello la importancia de los compuestos ricos en nitrógeno en esta vía de transporte. Sin embargo, en el floema la relación C/N es de 15 - 200, lo que indica que el nivel de carbono presente como carbohidratos, normalmente sacarosa, es muy alto respecto a los compuestos nitrogenados (Pate et al., 1975).

La forma en la cual el nitrógeno se transporta depende de como es absorbido y de su metabolismo en la raíz. Generalmente, todo el nitrógeno absorbido como amonio es asimilado en los tejidos de la raíz y redistribuido como aminoácidos, aunque su presencia ha sido detectada en el exudado del xilema (Pate, 1980). El nitrógeno absorbido como nitrato puede ser transportado sin alterar, por el tallo, hasta las hojas. El nitrato es un constituyente frecuente en el xilema, pero no el nitrito, especialmente si la raíz dispone de niveles altos de nitratos. (Atkins et al., 1979). El nitrato normalmente está ausente, o presente sólo en cantidades trazas en el exudado del floema (Pate et al., 1975).

Transporte del nitrógeno en la raíz.

La capacidad que tienen las raíces de reducir los nitratos varía ampliamente con las especies vegetales. Se ha evidenciado una correlación positiva entre los niveles de nitrato reductasa en la raíz y la relación N-orgánico/N-nitrato en el xilema (Oghoghorie, 1971).

En especies con poca actividad nitrato reductasa - en las raíces, alrededor del 95 % del nitrógeno del xilema está en forma de nitrato libre, sugiriendo que la actividad enzimática había sido insuficiente, para generar un "pool" de nitrógeno reducido que pudiera ser transportado, pero no necesariamente insuficiente para satisfacer, al menos, parte del nitrógeno orgánico necesario para el crecimiento de

la raíz (Radin et al., 1975 ; Radin, 1978). Hay especies vegetales que presentan una gran actividad nitrato reductasa, en la raíz, tal es el caso del altramuz y del rábano. En estas especies se observa un nivel bajo de nitratos en el tallo, incluso con niveles elevados de nitratos en el medio radical (Pate, 1973). Existe otro grupo de vegetales, que se incluyen en una categoría intermedia, en los cuales ambas formas de nitrógeno, orgánico e inorgánico, se transportan por el xilema en el tallo, con la probabilidad de que los tallos contengan más nitratos que nitrógeno orgánico, cuando los niveles de fertilización con nitratos sean elevados (Pate, 1973; Schrader, 1978).

Los estudios con Vigna y Pisum (Oghoghorie y Pate 1971), muestran que cuando los nitratos en el medio radical aumentan, el nivel de nitrógeno orgánico en el xilema se incrementa hasta un valor máximo que se alcanza a un nivel intermedio de nitratos en la raíz, por encima del cual la cantidad de nitrógeno presente en el xilema, como nitratos, incrementa progresivamente. Esto sugiere una saturación del sistema reductasa en la raíz. Sin embargo, Radin (1978), señala que es necesario realizar más estudios sobre la actividad nitrato reductasa en la raíz, la compartimentación entre nitratos y sus productos de reducción dentro de los tejidos de la raíz y la carga de nitratos y compuestos nitrogenados reducidos al xilema, para poder entender la diferente capacidad de las especies para asimilar los nitratos en las raíces.

La disponibilidad de carbohidratos en la parte aérea puede ser importante para regular la actividad nitrato reductasa, especialmente si el transporte de azúcares está limitado y se usa preferencialmente para el crecimiento de la raíz, proceso opuesto a la asimilación de nitratos (Radin et al., 1978).

La cantidad de fertilización nitrogenada aplicada a la raíz puede afectar la cantidad y la relación de compues

tos transportados; así en determinadas especies vegetales , cuando aumenta la cantidad de nitratos aplicados también - aumenta la relación N-nitrato/N-amino transportado. En cam bio, cuando se adiciona amonio a las raíces se produce una síntesis rápida de aminos, glutamina y asparagina, presumí- blemente como mecanismo de detoxificación (Lea y Mi~~flin~~, 1981).

Relación entre transporte y almacenamiento de nitrógeno.

Las plantas herbáceas acumulan cantidades signifi- cativas de nitrógeno en forma soluble, especialmente en el parénquima del tallo y en órganos de almacenamiento, como la raíz. Esto ocurre principalmente durante el periodo vegeta- tivo de la planta (Jackson y Volk, 1981) y bajo ciertas con- diciones de stress, esta tendencia se acentúa.

Muchas especies tienden a almacenar el nitrógeno , como nitratos en algunas ocasiones en cantidades cercanas al 5 % del peso seco del tejido correspondiente (Schrader, 1978). El "pool" de aminoácidos de estas plantas tiende a ser pe queño, por tanto la proteínosíntesis que acompaña al creci- miento está probablemente muy ligada a la asimilación de ni- tratos (Wallace y Pate, 1967). El nitrógeno acumulado en - forma de nitratos, puede servir para mantener procesos de - crecimiento, en determinados momentos tales como, cuando el nitrógeno suministrado al medio llega a ser limitante, cuan do el crecimiento reproductor demanda nitrógeno reducido a una velocidad que excede a la de absorción, o bajo periodos de stress (Jackson y Volk, 1981).

La forma en la cual el nitrato acumulado puede ser utilizable, no se conoce bien. Las medidas de actividad ni- tratoreductasa "in vivo", en ausencia de nitratos en el me- dio de incubación (Aslam et al., 1976), indican que el nitra- to está dividido en un "pool" metabólico relativamente pe-

queño y un "pool" de almacenamiento considerablemente mayor. En un tejido homogéneo se piensa que estos "pools" corresponden al citoplasma y a la vacuola respectivamente.

Jackson y Volk (1981) no pueden dar conclusiones definitivas sobre la regulación del movimiento de nitratos, desde el "pool" de almacenamiento en la raíz o en otros tejidos de la planta. Sugieren que el nitrato acumulado no es estático, sino que puede ser reducido e incorporado a compuestos orgánicos o bien transportado a otros órganos. Sin embargo, admiten que la utilización del nitrato acumulado puede no ser idéntica en todas las zonas del sistema radical. Las diferencias detectadas en la actividad nitrato reductasa entre la región basal y meristemática de la raíz, indican la posibilidad de una compartimentación espacial.

El almacenamiento de nitrógeno se hace en forma de nitrógeno inorgánico soluble, nitratos y en forma de nitrógeno orgánico soluble, aminoácidos y ureidos. Las raíces, tienen poco nitrógeno orgánico soluble pero pueden disponer de altas concentraciones de nitratos, incluso en especies con gran actividad nitrato reductasa (Radin, 1978; Atkins et al., 1979). Sin embargo, una gran parte del nitrato de la raíz puede estar localizado fuera del simplasto y por tanto no es realmente representativo de la capacidad de acumulación de las raíces.

3.3.3.- Metabolismo del Nitrato.

Las plantas que crecen en suelo, obtienen el nitrógeno principalmente en forma de nitratos, incluso si se utilizan fertilizantes amoniacales, puesto que el amonio puede ser oxidado a nitrato por los microorganismos del suelo (Walker, 1978 ; Huber et al., 1980). El nitrato absorbido por las plantas debe ser reducido a amonio para poder ser asimilado en forma orgánica. El proceso de reducción de

nitratos puede ocurrir predominantemente en raíces o en hojas, según la especie vegetal y los factores ambientales (Pate, 1973).

La reducción de nitratos depende de la actividad de dos enzimas: nitrato reductasa y nitrito reductasa, que han sido ampliamente estudiados en su aspecto bioquímico y fisiológico por diversos autores (Hewitt, 1975 ; Hewitt et al., 1976 ; Beevers, 1976; Hewitt y Cutting, 1979; Beevers y Hageman, 1980).

A asimilación de nitratos.

El metabolismo del nitrógeno se inicia con la reducción de nitratos a nitritos por el complejo enzimático nitrato reductasa (Figura 5) que se localiza, soluble en el citoplasma o asociada a la membrana del cloroplasto (Hewitt et al., 1976). Este complejo fue identificado y caracterizado en plantas superiores por Evans y Nason (1953). La reacción conlleva la transferencia de dos electrones y requiere específicamente NADH (Hageman y Hucklesby, 1971) sin embargo en soja (Jolly et al., 1976) y en escutelo de maíz (Campbell, 1976), se han aislado enzimas adicionales que muestran actividad tanto con el NADH como con el NADPH. La nitrato reductasa tiene un peso molecular de alrededor de 200.000 daltons y según recientes investigaciones está formada por 2 subunidades (Kuo et al., 1980). Es una flavo-molibdeno proteína que contiene un grupo hemo (Ahmed y Spiller, 1976).

La nitrato reductasa muestra una composición y mecanismo complejos. En la mayoría de los casos se pueden distinguir dos actividades distintas "in vitro": Una actividad flavín-diaforasa (deshidrogenasa) de reducción, utilizando NAD(P)H, de distintos aceptores de electrones, citocromoc, ferricianuro y colorantes como el DCIP y una actividad nitrato reductasa terminal que lleva a cabo la re

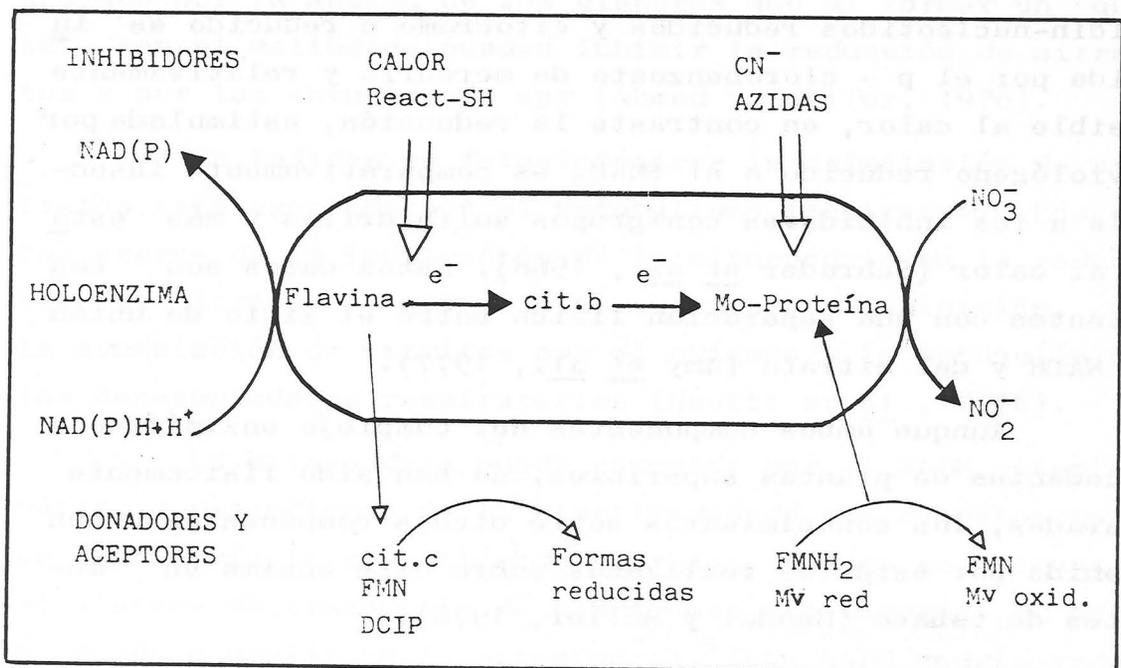


Figura 5.- Esquema básico de funcionamiento de la actividad nitrato reductasa.

ducción de nitritos por flavín mononucleótidos reducidos o por metil viológeno, independientemente de la actividad de los piridín nucleótidos.

Ambas actividades parciales del complejo responden de forma diferente a inhibidores selectivos. La actividad reductasa mediada por flavinas reducidas o metil viológeno, reducido es inhibida por cianuros y ácidos, sin embargo, la actividad diaforasa es insensible a estos inhibidores (Wallace y Johnson, 1978). La reducción de nitratos mediada por piridín-nucleótidos reducidos y citocromo c reducido es inhibida por el p - clorobenzoato de mercurio y relativamente sensible al calor, en contraste la reducción, estimulada por el viológeno reducido o el FMNH₂ es comparativamente insensible a los inhibidores con grupos sulfhidrilos y más estable al calor (Schrader et al., 1968). Estos datos son consistentes con una separación física entre el sitio de unión del NADH y del nitrato (Amy et al., 1977).

Aunque ambos componentes del complejo enzimático - procedentes de plantas superiores, no han sido físicamente separados, los conocimientos sobre dichos componentes se han obtenido por estudios realizados sobre este enzima en mutantes de tabaco (Mendel y Müller, 1978).

La fracción apoproteica del complejo (deshidrogenasa) aislada de extractos vegetales deficientes en molibdeno, puede ser activada por la adición de un factor con molibdeno (Rucklidge et al., 1976). El factor que contiene molibdeno no ha sido bien caracterizado, las indicaciones iniciales sugieren que este factor puede ser idéntico al que se presenta en otras molibdeno proteínas tales como la xantín-oxidasa y la sulfito oxidasa. Recientemente se ha observado que este factor puede contener también residuos de pteridina, la cual, puede estar involucrada en la transferencia de electrones desde el reductor al centro-molibdeno del enzima (Johnson et al., 1980).

El complejo proteína-molibdeno tiene un peso molecular alrededor de 30.000 daltons (Rucklidge et al., 1976). Se ha demostrado que el molibdeno es un constituyente del enzima purificado a partir de organismos procariotas y eucariotas (McGregor et al., 1974). Está presente en cantidades de 1 a 2 átomos/mol y se ha demostrado un papel crítico del molibdeno en la reducción de nitratos (Lee et al., 1974), relacionado con el transporte de electrones. Esto es apoyado por la acción de los cianuros que al formar un quelato con el molibdeno pueden inhibir la reducción de nitratos y por los estudios de epr (Ahmed y Spiller, 1976).

En tejidos no fotosintéticos la asimilación de nitratos está asociada con el metabolismo respiratorio. Los datos acerca de la implicación de la mitocondria en la reducción de nitratos se obtienen al observar, la inhibición de la acumulación de nitritos por el oxígeno y la actuación de los desacopladores respiratorios (Hewitt et al., 1976).

La mitocondria puede competir por el NADH citoplasmático y dependiendo de la efectividad de esa competencia, se deprimiría la reducción de nitratos. Cuando se bloquea el sistema de transporte de electrones mitocondrial, el NADH se puede acumular en la mitocondria. Este NADH podría reducir el ácido oxal-acético a málico que sería exportado al citoplasma, a través de un mecanismo de lanzadera de dicarboxilatos. En el citoplasma, el malato se oxidaría y generaría el NADH necesario para la reducción de nitratos. El NAD interno contribuiría a generar nuevos ácidos orgánicos (Hageman et al., 1980).

En tejidos fotosintéticos, la reducción de nitratos está estrechamente ligada a la luz vía flavinas (Panek et al., 1965), al NADPH (Evans y Nason, 1953) o a los productos fotosintéticos directos (Ramírez et al., 1964).



Actividad nitrato reductasa en plantas.

La mayoría de los estudios del metabolismo del nitrógeno han sido realizados en hojas, cuyos niveles de actividad nitrato reductasa son elevados. La máxima actividad nitrato reductasa, en hojas, se obtiene justo antes de alcanzar la máxima expansión. Los peciolo y tejidos no clorofílicos de las hojas detentan una actividad enzimática despreciable. Las glumas y espículas del trigo poseen una cierta actividad nitrato reductasa mientras que en las vainas de leguminosas esta actividad es desestimable (Beevers y Hageman 1980).

Hay órganos en los cuales el potencial genético para la síntesis de este enzima puede estar reprimido, tal es el caso de las raíces de Xantium pennsylvanicum con una ausencia casi total de actividad nitrato reductasa, deducido del hecho que el 95% del nitrógeno total del xilema son nitratos (Pate, 1973). En general, las raíces contienen una fracción de actividad nitrato reductasa del orden del 10-30% de la detectada en hojas (Beevers y Hageman, 1969), por el contrario en hojas de girasol la actividad nitrato reductasa es del orden del 1,7% de la detectada en raíces.

La reducción de nitratos en raíces y hojas es distinta según las especies y varía durante el ciclo de vida. Pate (1973) indica que los cereales reducen los nitratos tanto en raíz como en hoja, mientras que en leguminosas (Vicia, Pisum, Phaseolus y Lupinus) este proceso tiene mayor relevancia en raíz. Coic (1971), concluye que en maíz los nitratos se reducen mayoritariamente en la raíz mientras que en tomate es en las hojas.

En condiciones de campo el lugar de asimilación de los nitratos (raíz o brote) se complica por la variabilidad en la disponibilidad del nitrógeno del suelo. Cuando la disponibilidad del nitrato es baja, puede disminuirse la asimilación de nitratos en la raíz, especialmente si los "pools" de almacenamiento de nitratos en la planta han sido agotados (Beevers y Hageman, 1980).

Reducción de nitritos.

El nitrito producido por la nitrato reductasa es reducido a amoníaco directamente, sin la utilización de intermediarios, por la nitrito reductasa, figura 6. Este enzima, ha sido ampliamente caracterizado en extractos de hoja y presenta un peso molecular de 62.000 daltons. No se disocia con el SDS y por tanto aparentemente no contiene subunidades (Vega y Kamin, 1977). El enzima purificado muestra unos picos de absorción a 380 - 390 nm y 570- 580 nm y contiene 3 átomos de Fe por mol de enzima (Vega y Kamin, 1977). Estas observaciones indican la presencia de una ferro-porfirina, sirohemo, en conjunción con un centro Fe - S en el enzima.

La secuencia de la transferencia de electrones que se sugiere en la reducción de nitritos, se inicia con la reducción del sirohemo por un electron de la ferredoxina, en el caso de tejidos no fotosintéticos varía el donador de electrones. El grupo hemo reducido reacciona con el nitrito para formar un complejo hemo-nitrito que facilita la reducción del centro Fe- S. Los electrones pueden transferirse desde este centro al complejo sirohemo ligado al nitrógeno. Este complejo recibe un electrón y se transforma en un complejo sirohemo- NO. Las posteriores transformaciones de este complejo hasta el complejo enzima - NH_4^+ , implican la adición de 5 electrones, cuya secuencia de transferencia y los intermediarios formados no se conocen (Hucklesby et al., 1979).

El donador de electrones fisiológico para la reducción de nitritos parece ser la ferredoxina reducida (Beever y Hageman, 1969; Hewitt, 1975), la cual se genera en las hojas durante los eventos fotoquímicos asociados al fotosistema I.

Esta fuente de poder reductor es consistente con la localización del enzima en el cloroplasto (Grant et al., 1970). "in vitro" el metil viológeno reducido puede funcio-

nar como donador de electrones, pero no los piridín y flavinnucleótidos.

En tejidos no fotosintéticos este enzima parece estar localizada en el protoplasto (Dalling *et al.*, 1972). La fuente de poder reductor en estos tejidos puede ser el NADPH producido por el ciclo de las pentosas fosfato. Esta aseveración está basada en los experimentos realizados por Ems *et al.* (1979). Estos autores observaron que el nitrito estimula el catabolismo de la glucosa por la vía PPP en plántulas y que en las raíces, una glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa, se induce por la exposición al nitrato. Sin embargo mientras el NADPH puede ser la fuente de poder reductor para la nitrito reductasa, este piridín nucleótido reducido no puede estimular la reducción de nitritos "in vitro". Parece que en tejidos no fotosintéticos, un transportador de electrones no identificado, debe estar involucrado para sustituir a la ferredoxina que es el reductor directo del enzima en la hoja (Bourne y Miflin, 1973).

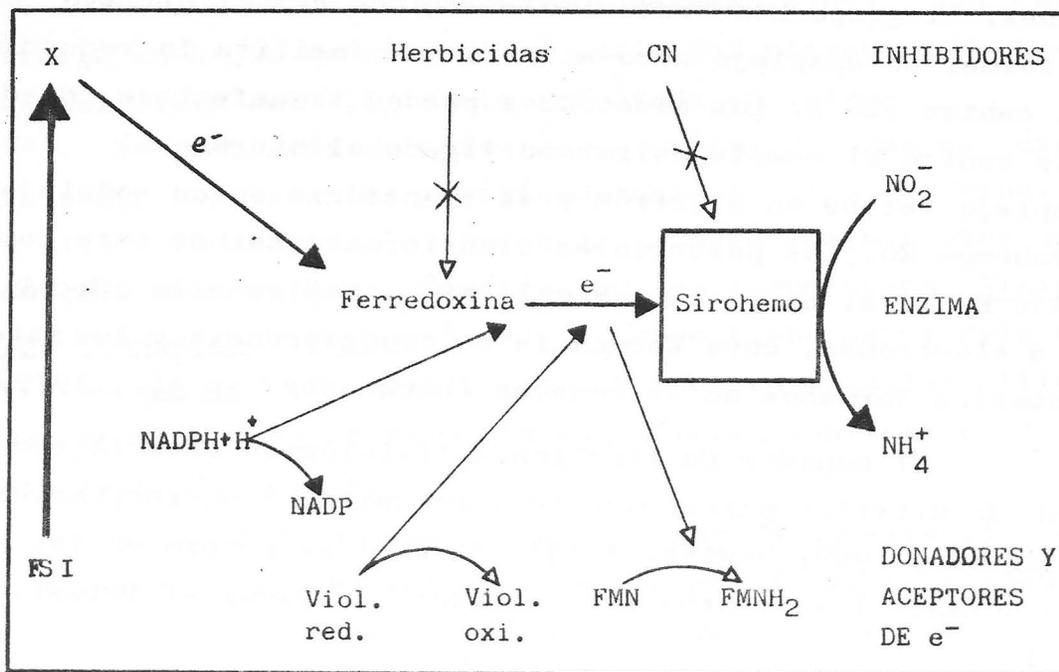


Figura 6.- Esquema básico de funcionamiento de la actividad nitrito reductasa.

Regulación de la actividad nitrato reductasa.

La actividad enzimática en la planta puede considerarse como un balance entre la síntesis/degradación y la activación/inactivación. Hay numerosos factores que pueden afectar la actividad del enzima interfiriendo con alguno de esos procesos (Hewitt, 1975 ; Hewitt et al., 1976).

La nitrato reductasa es un enzima inducible por su sustrato y generalmente existe una correlación positiva entre la actividad enzimática y la concentración del sustrato (Aslam et al., 1976; Kapor et al., 1978). También se observa una correlación entre la nitrato reductasa y el crecimiento de la planta. Parece posible pensar que, si los nitratos no se correlacionan con la actividad del enzima, la mayor parte de éstos estarían en el "pool" de almacenamiento y no en el metabólico.

Utilizando nitrato marcado se ha demostrado la síntesis de "novo" de la nitrato reductasa, inducida por los nitratos (Zielke y Filner, 1971). Esto está apoyado por los datos recogidos en otras investigaciones relacionadas con el uso de los inhibidores de la síntesis de proteínas (Hewitt, 1975).

El efecto del amonio y aminoácidos como productos finales de la asimilación de nitratos, sobre la actividad nitrato reductasa, ha sido estudiado por diversos investigadores. Las plantas que crecen en un medio amoniacoal tienen, una actividad enzimática menor que las que crecen en un medio con nitratos. El amonio puede inhibir la actividad nitrato reductasa (Marwah y Juliano, 1976). Sin embargo, hay otros autores (Oaks et al., 1977) que no pueden demostrar esta inhibición por el amonio. Esto podría indicar que la regulación de la nitrato reductasa es distinta según los tejidos.

El amonio puede inhibir la actividad nitrato reductasa bien por interferir con su síntesis o por limitar la absorción de nitratos. Alternativamente, el amonio puede inhibir la actividad del enzima bien por una degradación activa o por una modulación física de la molécula del enzima. La evidencia de esta última posibilidad ha sido demostrada en algas, donde se ha observado que la inactivación de la NRasa por amonio es reversible (Losada et al., 1973). En plantas superiores el mecanismo de acción probable puede ser la inactivación del enzima, ya que cuando se adiciona el amonio a plantas con actividad NRasa inducida por nitratos, se produce una pérdida rápida de la actividad del enzima (Orebamjo y Stewart, 1975).

Los aminoácidos pueden inhibir la actividad nitrato reductasa inducida por su sustrato (Oaks et al., 1977). Si bien el efecto inhibitor de determinados aminoácidos es revertido por otros (Radin, 1977). La interpretación de estos resultados es difícil puesto que los aminoácidos aplicados pueden interferir, con el crecimiento, con el metabolismo, con la absorción de nitratos o con la distribución de nitratos dentro del vegetal y por tanto interferir con el proceso de inducción.

Ha sido abordado el estudio del efecto de varias sales inorgánicas e iones sobre la actividad nitrato reductasa. Los compuestos de molibdeno son los más estudiados, ya que el molibdeno es un componente de la molécula de la nitrato reductasa. El molibdeno suministrado exógenamente estimula la actividad nitrato reductasa (Hewitt, 1975).

El tungsteno es un inhibidor competitivo del molibdeno y cuando se incorpora a la molécula enzimática, la actividad disminuye. De forma semejante actúa el vanadio (Vega et al., 1971).

El efecto del ClNa en la actividad nitrato reductasa es variado, mientras que en cotiledones de Phaseolus acotitifolium y en tallos de Zea mays se induce la actividad, en

Atriplex confertifolia se inhibe (Kleinkopf et al., 1975). Algunos cationes monovalentes como el Li^+ , K^+ , Na^+ , y Rb^+ , no afectan al nivel de nitrato reductasa "in vitro", pero "in vivo", la actividad es fuertemente afectada por el Rb^+ y el Ca^{++} (Blevins et al., 1978).

Se ha estudiado también el efecto del azufre sobre la actividad NRasa. Este enzima contiene grupos SH en su molécula y se ha comprobado que las deficiencias de azufre disminuyen la actividad de la NRasa en Zea mays. Sin embargo, el azufre no es limitante y su aplicación no afecta a la nitrato reductasa en Phleum pratense y en Panicum virgatum, (Friedrich et al., 1978). La deficiencia de hierro disminuye la actividad nitrato reductasa en las raíces y en hojas de plantas calcícolas y no afecta a las plantas calcífugas -- (Brown y Jones, 1976).

Las giberelinas no afectan la inducción de la NRasa en las capas de aleurona de Hordeum vulgare, sin embargo, una combinación de giberelina y citoquininas aumenta la reducción de nitratos en hojas. Las giberelinas y citoquininas, aplicadas simultáneamente, pueden sustituir a la luz en el mantenimiento de la actividad NRasa en hojas de Nicotiana tabacum. La auxina también afecta positivamente la actividad NRasa y se ha establecido que su efecto no es debido a la estimulación de la proteínosíntesis, (Lips y Roth-Bejerano, 1969).

La inducción de la NRasa por citoquininas involucra una proteínosíntesis de "novo" por lo que esta inducción es inhibida por la cicloheximina y la actinomicina D. Sin embargo, el mecanismo de inducción de la NRasa por las citoquininas es diferente a la inducción provocada por los nitratos, pues mientras la bencil adenina pierde en efectividad como inductor a las 24 horas, el efecto de los nitratos no está limitado (Kende y Shen, 1972).

La luz es esencial para la inducción de la nitrato reductasa por su sustrato (Travis et al., 1970), aunque Travis y Key (1971) demostraron la inducción de la NRasa en la oscuridad. En la mayoría de las especies estudiadas, el nivel de enzima en la parte de la planta que crece expuesta a la luz es mayor que en aquellas que crecen en la oscuridad. La regulación aparentemente está mediada por el fitocromo. Este fotorreceptor puede actuar en el sitio de absorción del nitrato o puede involucrar una modulación de la accesibilidad del nitrato celular al lugar de la inducción enzimática (Jones y Sheard, 1975).

Se han propuesto algunas hipótesis para explicar el mecanismo de inducción-activación de la actividad nitrato - reductasa por la luz : a) La luz puede activar la enzima por un incremento de la absorción de nitratos (Rao y Rains, 1976), esta hipótesis sólo podría aplicarse si el nitrato suministrado fuese limitante; b) La segunda hipótesis concluye que la fotosíntesis estaría involucrada en la inducción del enzima por la luz (Brown y Jones, 1976), sin embargo, la presencia de NRasa en tejidos que crecen en la oscuridad (Travis y Key, 1971) y el hecho de que en tejidos no fotosintéticos, como el endospermo y escutelo, también se estimule la actividad nitrato reductasa con la luz (Srivastava, 1974) , abogan en detrimento de esta hipótesis; c) la luz puede incrementar la actividad enzimática induciendo la síntesis de proteínas ya que la luz induce la síntesis m-RNA. Esta hipótesis, parece ser viable en algunas condiciones, sin embargo, hay que tener en cuenta que la inducción de la NRasa por la luz es insensible a la cicloheximina (Johnson, 1976), por lo que esta tercera hipótesis, se cuestiona; d) Recientemente, Jolly y Tolbert (1978) han demostrado que los niveles de NRasa en la luz y oscuridad pueden estar regulados por la actividad relativa de inhibidores y activadores específicos. Ellos proponen que un inhibidor se produce en la oscuridad y es inactivado reversiblemente por

la luz. El inhibidor ha sido detectado en distintas especies vegetales (Wallace, 1973).

Significado del estudio de la actividad nitrato reductasa.

El nivel de la actividad NRasa puede reflejar la velocidad de suministro del nitrógeno reducido, necesario para el crecimiento de la planta. Esto ha sido confirmado, con los trabajos de Brunetti y Hageman (1976) que demostraron que la nitrato reductasa está correlacionada ($r^2 < 0,9$), con la acumulación de nitrógeno reducido cuando el nitrato no es limitante, en diversos genotipos de maíz. Sin embargo los intentos de utilizar la actividad NRasa como criterio para la selección de cultivos, con capacidad para producir más cosecha o más proteína, han sido variables (Hageman, 1979).

En el caso de las leguminosas, Franco et al. (1979) trabajando con Phaseolus vulgaris L., encontraron que la actividad nitrogenasa declina rápidamente después de la floración y tras esto aumentaba la actividad NRasa. La aplicación en este momento de nitrógeno en forma de nitrato (40 kg/Ha) provocó un incremento en la actividad NRasa y casi se duplicó la cosecha de judías.

Se han encontrado correlaciones entre la actividad nitrato reductasa y varios componentes de la cosecha en varios cultivos (Beevers y Hageman, 1980). En general las correlaciones no han sido lo suficientemente altas como para que se utilice como criterio para establecer el adecuado estado nutritivo de un cultivo y su capacidad para producir mayores cosechas.

3.3.4.- Deficiencias de Nitrógeno en Plantas.

El diagnóstico visual de deficiencias de nutrientes suministra un medio útil para valorar las condiciones nutricionales de un cultivo. Los síntomas visuales de deficiencias, son sólo la consecuencia de una alteración metabólica debida a diferentes causas que conducen a síndromes muy similares, siendo éste el caso de la deficiencia de nitrógeno.

La deficiencia de nitrógeno, se inicia con una pérdida de color verde en las hojas viejas, clorosis, que se generaliza en la planta. Este sintoma está provocado por una alteración en el desarrollo del cloroplasto. Cuando la deficiencia es muy intensa aparecen manchas necróticas en las hojas, pero siempre en época tardía. En este aspecto, la deficiencia de nitrógeno difiere fundamentalmente de la de potasio y magnesio donde los síntomas aparecen en las hojas viejas pero las manchas necróticas se inician en los estadios iniciales de deficiencia. La clorosis provocada por deficiencias de Fe, Cu y S es semejante a la producida por la deficiencia de nitrógeno, si bien en el primer caso aparece en las hojas jóvenes (Epstein, 1972).

A nivel de planta entera el primer síntoma es una detención del crecimiento (Chapman, 1966). Las plantas quedan pequeñas, los tallos se tornan delgados, las hojas son pequeñas y las viejas a menudo caen prematuramente. El crecimiento de la raíz también se ve alterado y se restringen las ramificaciones. La relación raíz/brote aumenta con la deficiencia de nitrógeno (Casper, 1975).

Las plantas que sufren deficiencia de nitrógeno, mueren antes y el crecimiento vegetativo se acorta. Esta precocidad en la senescencia probablemente está relacionada con el efecto del nitrógeno en la síntesis y transporte de citoquininas. Según Wagner y Michael (1971), la síntesis de ci

toquininas disminuye con una nutrición nitrogenada inadecuada. Como esta fitohormona promueve el crecimiento y la retención de la planta en estado juvenil, una deficiencia de citoquininas puede producir la senescencia.

Bates (1971) define el contenido de nitrógeno al iniciarse la deficiencia, como la "concentración crítica" que es específica para cada parte de la planta y para cada periodo específico de crecimiento. Aunque es un valor interesante, su utilidad está limitada. Más recientemente se ha considerado oportuno definir el término "rango de suficiencia", siendo el límite inferior del rango de suficiencia, la concentración crítica (Chapman, 1966). Las investigaciones de Hanway y Dumenil (1965) sugieren que la concentración crítica de nitrógeno puede variar dependiendo del nivel de fósforo en la planta. Sin duda otra relación similar y con otros elementos pueden existir en los vegetales.

Es obvio que el nitrógeno total de la planta disminuye, cuando el suministro de nitrógeno es inadecuado. Cuando tienen un nivel adecuado, se observa que existen formas solubles de nitrógeno en forma de nitratos o de compuestos orgánicos solubles como las aminas y ureidos. Sin embargo, si es deficitario el nitrógeno disponible, estas formas solubles de nitrógeno desaparecen (Mills y Jones, 1979). En plantas intactas, ante una deficiencia de nitrógeno, se observa que se produce un cambio en el pH intracelular que solubiliza las formas de nitrógeno combinado en los tejidos viejos. Estas formas de nitrógeno soluble son transportadas a los meristemas y órganos jóvenes. Sin embargo, no se conoce bien la distribución de los distintos compuestos de nitrógeno en la madurez y senescencia de las plantas.

3.3.5.- Exceso de Nitrógeno en Plantas.

Es difícil determinar visualmente los estados iniciales de un exceso de nitrógeno. Cuando éste existe, las plantas crecen vigorosamente, exhiben un color verde oscuro en las hojas y se estimula el crecimiento vegetativo en vez de desarrollarse las flores y frutos (Ligero y Lluch, 1982). La calidad del fruto puede verse afectada negativamente. Las plantas pueden llegar a ser suculentas y fácilmente susceptibles a infecciones y al ataque de insectos. Un exceso de nitrógeno puede alterar el equilibrio de nutrientes, o producir deficiencias de otros elementos en las plantas, como en el caso del azufre (Ligero et al., 1981b; Lluch et al., 1983). Un exceso de nitrógeno altera la relación crítica - N/S indicando deficiencias de azufre en la planta.

Wright y Davison (1964) elaboraron un informe en el cual describen las familias botánicas con tendencia a acumular nitratos. Se deduce del mismo, que los cereales y otras plantas anuales acumulan más nitratos que las leguminosas y plantas perennes. Con el exceso de nitrógeno suministrado a la planta, las formas de nitrógeno soluble empiezan a acumularse en los tejidos, aunque no se ha estudiado adecuadamente la distribución de estas formas de nitrógeno. La sensibilidad al exceso de nitrógeno es variada y depende de la especie vegetal, del estadio de crecimiento y del hábitat, entre otros factores.

Los nitratos no se acumulan uniformemente en toda la planta (Beever y Hageman, 1969; Cantliffe, 1972). La edad de la planta y la actividad nitrato-reductasa van a influir en la acumulación y la distribución de nitratos (Barker y Maynard, 1972). En general, los peciolo y los tallos son lugares de máxima acumulación de nitratos. Las hojas acumulan más que las raíces, siendo la acumulación en los órganos reproductores menor (Barker y Maynard, 1972). Sin embargo Blanc y Morisot (1980), señalan que la acumulación de ni

tratos en las raíces es importante. Los nitratos tienden a acumularse en las zonas viejas de la planta como resultado de una disminución de la actividad nitrato-reductasa (Barker y Maynard, 1972). La acumulación de nitratos en los tejidos no fotosintéticos se produce a causa de la limitada capacidad para la reducción y asimilación de nitratos en estas áreas (Barker et al., 1974). Viets y Hageman (1971) sugieren que el nivel del transportador de nitratos puede variar con la especie vegetal y la edad fisiológica de la planta.

La adición incontrolada de fertilizantes nitrogenados puede inducir a la acumulación de niveles excesivos de nitratos en los vegetales. Hay autores que señalan la existencia de una relación directa entre la cantidad de nitratos suministrados como fertilizantes y el contenido de éstos en la planta (Barker et al., 1974), en cambio si el fertilizante es amoniacal la acumulación de nitratos se reduce (Barker et al., 1971).

Otros factores que pueden contribuir a la acumulación de nitratos en plantas son, la temperatura, las variaciones diurnas, la humedad, las altas intensidades de luz, la calidad de la luz y la longitud del fotoperiodo (Cantliffe, 1972). Altas concentraciones de nitratos en el medio pueden producir una caída de los carbohidratos de reserva que conlleva, una disminución en la asimilación de nitratos y un aumento de la concentración de éstos en los tejidos (Beevers y Hageman, 1969).

Suficiencia de nitrógeno en las plantas,

Definir la suficiencia de nitrógeno, en términos de nitrógeno total en planta o parte de la planta, por el método de Kjeldahl, ha sido de gran interés para los que confían en el análisis foliar, ya que con este parámetro po-

dían conocer la suficiencia nutritiva en un cultivo. Sin em bargo como se describió anteriormente, el análisis de la - planta depende del "valor crítico", siendo este parámetro - más adecuado como base para definir la suficiencia nutritiva de un elemento, incluyendo el nitrógeno.

Otro parámetro que se ha discutido ha sido el "rango de suficiencia" el cual se inicia con el valor crítico y finaliza con el punto inicial de exceso. El rango de suficiencia puede ser definido como el rango en la concentración de un elemento nutritivo que proporciona la máxima cosecha. Lógicamente las concentraciones de nitrógeno que determinan el "rango de suficiencia" en las plantas varían considerablemente con las especies. En general, las leguminosas tienen unos requerimientos de nitrógeno mayores que las no leguminosas.

La determinación de nitratos en los tejidos, puede ser un método útil para determinar el status de nitrógeno en la planta. La presencia de nitratos en el tejido conductor, aún en concentraciones de 100 a 1000 ppm, normalmente define la suficiencia de nitrógeno. La carencia de nitratos en estos tejidos señalan la deficiencia, mientras que una gran concentración de nitratos indica el exceso de nitrógeno (Mills y Jones, 1979).

3.3.6.- Toxicidad del Amonio.

En plantas superiores, una exposición prolongada de sus raíces a un medio con N-amónico en exceso, puede producir determinadas alteraciones fisiológicas y morfológicas como son clorosis en hojas, manchas necróticas, detención del crecimiento y en algunos casos la muerte de la planta, (Smiley, 1974). Los síntomas de toxicidad del amonio, clorosis y necrosis, indican una interrupción en la formación de cloroplastos. Krogmann et al. (1959), mostraron que el amo-

nio es un efectivo, desacoplador reversible de la fotofosforilación fotosintética.

El nivel de amonio libre intracelular en una planta con metabolismo normal es bajo (Sheat et al., 1959). Cuando se aplican niveles altos de amonio el metabolismo de la planta se altera. Las reservas de carbohidratos disminuyen, se afecta el crecimiento de la raíz (Smiley, 1974) y el proceso respiratorio.

Los efectos tóxicos son debidos al NH_3 . Se ha determinado que el metabolismo y el crecimiento de la planta, se altera a concentraciones de NH_3 a las cuales el amonio no es dañino. El mecanismo de toxicidad del NH_3 es desconocido, Bennett (1974) sugiere que la toxicidad del amoniaco está íntimamente relacionada con su facilidad en atravesar las membranas celulares. Esto está de acuerdo con los datos de Heber et al. (1974) que muestran que la membrana externa del cloroplasto fue impermeable al ion amonio pero permitía la difusión del NH_3 .

Es evidente que el efecto tóxico del N-amónico, está mediado por el NH_3 (acuoso) y probablemente ocurre a pH altos (Hengel y Kirkby, 1982). A pH ácidos o neutros muchas especies vegetales son tolerantes a niveles altos de N amónico, puesto que los protones impiden la formación de NH_3 . Hay que recordar que la distribución de NH_4^+ y NH_3 en una solución acuosa está regulada por el equilibrio $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$ y este equilibrio depende del pH del medio (Bennett, 1974). Por tanto, existen algunos cultivos que pueden crecer bien, en niveles altos de N-amonio, siempre que el pH oscile entre 4 y 6 (Breteler y Smith, 1974).

La mayor desventaja que presenta la utilización de fertilizantes amoniacales es la toxicidad del amoniaco, por ello muchos investigadores señalan la importancia de mantener el pH adecuado cuando se utiliza el amonio como fuente de nitrógeno (Barker et al., 1966). Maynar et al. (1969) encuentran que las soluciones nutritivas se acidifican mu -

cho cuando los iones amonio son extractados por la planta. La absorción radical de cationes es mayor que la de los aniones, cuando el nitrógeno se suministra en forma de amonio, favoreciéndose la liberación al medio de protones para mantener el balance de cargas. El cambio de pH está influenciado por la velocidad de absorción de aniones y cationes en las raíces. Sin duda, el control del pH en la rizosfera parece ser un medio eficaz para poder utilizar los fertilizantes amoniacaes con especies vegetales no tolerantes al amonio.

3.3.7.- Nitrógeno como Fertilizante.

En experimentos realizados con suelos de cultivo, el nitrógeno resultó ser el factor limitante más importante aunque se ha observado una gran variación, en cuanto a las deficiencias de nutrientes en las diferentes partes del mundo (Robinson, 1975).

El nitrógeno se encuentra acumulado en gran proporción en suelos de cultivo y en sistemas naturales de vegetación, sin embargo en la mayoría de sistemas agrícolas puede ser fuertemente limitante para la productividad por dos razones :

a) El nitrógeno que se elimina en la explotación del cultivo es mayor que el que retorna en condiciones naturales a través de la lluvia, el polvo, o la fijación biológica en vida libre y en simbiosis.

b) Las plantas anuales agrícolas, demandan más nitrógeno que los sistemas naturales.

El resultado es que la economía y la fertilización del nitrógeno es crítica en el manejo del cultivo y en investigación agrícola (Novoa et al., 1981).

3.3.7.1.- Respuesta a la Aplicación de Nitrógeno.

Los cultivos generalmente responden a la fertilización nitrogenada aunque no siempre ocurre así, puesto que esta respuesta puede depender de las condiciones del suelo, de la especie de cultivo y del resto de los nutrientes minerales suministrados al cultivo (Scharpf y Wehrmann, 1975).

Cuando la respuesta a la fertilización nitrogenada es pobre se ha de pensar en que el contenido de nitrógeno o el contenido de materia orgánica en el suelo es alto. La relación entre la respuesta a la fertilización nitrogenada y la materia orgánica del suelo ha sido estudiada por Molle y Jessen (1968) en experiencias de campo. Estos autores encontraron que en suelos ricos en materia orgánica, una proporción de 45 Kg N/Ha fue suficiente para alcanzar las cosechas óptimas. Sin embargo, en estos suelos, si la mineralización es muy rápida o el cultivo sigue a uno de leguminosa en un sistema de rotación, es innecesaria la aplicación de nitrógeno.

Otro factor importante que determina la respuesta del cultivo a la fertilización nitrogenada es el agua. La respuesta a la aplicación de nitrógeno va a estar limitada por la disponibilidad de agua, llegando incluso a ser perjudicial bajo condiciones de sequía.

3.3.7.2.- Nitrógeno Combinado en la Simbiosis Rhizobium-Leguminosa.

Efecto del nitrógeno combinado en la nodulación.

El nitrógeno combinado afecta al proceso de nodulación de las raíces de la planta huésped infectada por Rhizobium. Parece ser que el nitrato actúa a varios niveles :

a) Afecta al inicio de la infección ya que a las 24 horas de haber inoculado, se reduce el número de filamentos de infección e incrementa el número de filamentos abortados (Munns, 1968 c); b) Favorece la senescencia de los nódulos jóvenes y todavía efectivos (Munns, 1968 c; Dart, 1974); c) Altera el mecanismo de reconocimiento entre planta hospedadora y bacteria. Se ha demostrado que la cantidad de R. trifolii unidos a las lectinas de las raíces de trébol y la cantidad de poligalacturonasa inducida por los polisacáridos de esta bacteria disminuyeron cuando las plantas crecían en presencia de nitratos (Dazzo et al., 1978; Dazzo et al., 1979); d) Reduce el número de pelos radicales con el "curling" característico en plantas de alfalfa. Thorton (1936) sugirió que esta reducción es la responsable del menor número de nódulos, formados en presencia de nitratos. Los estudios de Thorton, fueron más tarde confirmados en una serie de experimentos - por Munns (1968 a; 1968 b; 1968 c). Munns concluyó que la reducción en el número de nódulos no podía ser atribuida solamente al nitrato, ni incluso a la interferencia del nitrato con alguna de las fases del proceso de nodulación.

El efecto del nitrógeno combinado en la fijación de nitrógeno depende de la estirpe de Rhizobium, de la planta huésped (Gibson, 1977), de la forma y cantidad de nitrógeno adicionado (Vigue et al., 1977) y del tiempo de aplicación (Havelka y Hardy, 1976). En general, el nitrógeno reduce la nodulación (Awonaike et al., 1980) pero cuando se suministra en cantidades pequeñas la nodulación puede ser aumentada (Pate y Dart, 1961).

Parecía que los nitratos podrían influir también en la acción que el ácido indol acético ejerce en el inicio y desarrollo de la simbiosis. Tanner y Anderson (1963) observaron que la adición de nitratos no afecta la conversión de triptófano en auxina. Sin embargo, en ausencia de nitratos, el nivel de ácido indol acético era mayor, esto puede indicar que el nitrato cataliza la destrucción del AIA. Por otra

parte, se ha demostrado que la aplicación de AIA puede mitigar la inhibición de la nodulación por nitratos. A este respecto, Valera y Alexander (1965) informaron que cuando a las plantas de alfalfa se les suministra auxina y nitratos, la nodulación fue semejante a la de las plantas sin nitratos. Estos autores sugirieron que la auxina puede estimular el crecimiento de la planta y la asimilación de nitrógeno de forma que la concentración de nitratos disminuya por debajo del nivel necesario para que actúe como inhibidor.

El crecimiento del sistema radical es otro aspecto que se ve influenciado con la presencia de nitratos. Los sistemas radicales nodulados parecen ser metabólicamente más activos que los sistemas radicales similares que carecen de nódulos y utilizan el nitrógeno en forma de nitratos (Ryle et al., 1978), puesto que muestran un amplio rango de procesos metabólicos e importan gran cantidad de metabolitos carbonados del tallo. Las plantas noduladas siempre exhiben una relación raíz/brote mayor que las tratadas con nitratos (Ryle et al., 1981).

Todo esto implica que el nitrógeno combinado exógeno no tiene efectos significativos sobre la bacteria y sobre la planta, lo cual complica considerablemente las investigaciones y las interpretaciones.

Efecto inhibidor del nitrógeno combinado en la fijación.

El nitrógeno combinado ha sido repetidamente descrito como limitante de la fijación de nitrógeno en leguminosas (Oghoghorie y Pate, 1971; Manhart y Wong, 1980; Rabie et al., 1980). Se han estudiado aspectos que abordan el mecanismo del posible efecto inhibidor del nitrógeno combinado.

Oghoghorie y Pate (1971) observaron que a medida - que se suministran nitratos a un cultivo de guisantes, la nitrato reductasa del brote incrementa espectacularmente. Estos niveles de enzima utilizan grandes cantidades de carbohidratos y reductores producidos fotosintéticamente, por tanto privan a la raíz y a sus nódulos de que tales sustratos se consuman en el proceso de fijación. Wong (1980) determinó que si el nivel de carbohidratos es suficiente, la fijación de nitrógeno en nódulos es similar tanto si los cultivivos han tenido o no nitratos.

Los nitratos en los cultivos de leguminosas pueden ser reducidos a nitritos por la nitrato reductasa de los - bacteroides (Rigaud et al., 1973). Los nitritos podrían inhibir la actividad nitrogenasa o formar un complejo con la leghemoglobina, que es la que se une con el oxígeno y lo transporta al bacteroide, interfiriendo con el proceso de fijación de nitrógeno (Gibson, 1977; Wong, 1980). Esto está apoyado por la caída observada en la actividad de los nódulos, en raíces sometidas a altos niveles de nitratos, que se ha demostrado ser debida a una gran pérdida de la leghe moglobina de los nódulos (Oghoghorie y Pate, 1971).

Bisseling et al. (1978) han deducido que el efecto negativo del nitrato amónico en los nódulos de guisante puede relacionarse con la inhibición de la síntesis de leghemoglobina y no en la inhibición de la síntesis de nitroge nasa. Por otra parte Gibson y Pagan (1977), Manhart y Wong (1980) estudiando el efecto del nitrato sobre la nitrato reductasa de diversas razas de Rhizobium, concluyeron que es poco probable que el nitrito producido por la nitrato reductasa del bacteroide sea responsable del efecto inhibitor del nitrato en la fijación de nitrógeno en nódulos radicales de leguminosas.

Al intentar encontrar una explicación fisiológica al efecto del nitrógeno combinado, se ha centrado el proble ma en el efecto del nitrógeno en forma de nitrato. Hay dos hipótesis al respecto.

Small y Leonard (1969) defienden que los nitratos inducen la actividad nitrato reductasa en los ápices de la raíz y se desvía el fotosintato de los nódulos hacia dichos ápices. Es posible pensar que los bacteroides del nódulo, privados de su fuente energética carbonada, no disponen de suficiente ATP y ello afecta considerablemente la fijación del nitrógeno atmosférico.

Rigaud (1976), defiende la idea de que los productos formados en la nitrato reducción, los nitritos, son inhibidores de la fijación de nitrógeno en bacteroides aislados. Los nitritos inhiben extractos de nitrogenasa preparados a partir de los bacteroides.

Para investigar estas dos hipótesis Chen y Phillips (1977) llevaron a cabo dos experimentos. En el primero incrementaron el dióxido de carbono en la atmósfera que rodea a la planta, esto hizo que aumentara el fotosintato disponible para los nódulos. En la segunda indujeron la actividad de la nitrato reductasa aplicando nitrógeno en forma de nitrato directamente a las hojas. En ninguno de los dos experimentos se encontró qué aspectos de la actividad del nódulo están relacionados con la inhibición por el nitrato. No obstante, se inclinan por la hipótesis de Rigaud (1976).

En otro tipo de experimentos, trabajando con Trifolium subterraneum nodulado con dos mutantes de Rhizobium una deficiente en nitrato reductasa y la otra no, se observó que los nódulos de plantas infectadas con la primera raza son capaces de producir nitritos, los cuales se suponen que serán la causa de la nitrato-inhibición de la actividad del nódulo. No se encuentra correlación entre la capacidad de producir nitritos y la inhibición de la actividad del nódulo por nitratos (Gibson y Pagan, 1977). Estos investigadores se inclinan más por la hipótesis de Small y Leonard (1969).

Significado del nitrógeno en la nutrición de leguminosas.

Los resultados obtenidos con la aplicación de nitrógeno combinado son conflictivos, mientras que estos efectos son favorables para el crecimiento vegetativo no se observan efectos semejantes en el resultado final de la cosecha (Lluch et al., 1983).

Se ha observado que la aplicación de nitrógeno combinado a leguminosas, aumenta el peso seco y el nitrógeno en los tejidos, respecto a las que sólo depende de la fijación simbiótica de nitrógeno, sugiriendo que probablemente ésta no suministra todo el nitrógeno requerido para el óptimo crecimiento (Dean y Clark, 1980 ; Rabie et al., 1979).

La fertilización nitrogenada puede promover la producción y el contenido proteico de semillas de leguminosas, por tanto, parece ser esencial la aplicación de nitrógeno junto con el nitrógeno fijado (Haque et al., 1980). Respecto a esto, Bhangoo y Albritton (1976), recomiendan que la proporción de nitrógeno aplicado podría localizarse dentro del rango en el cual la fijación simbiótica no es inhibida.

Otros estudios indican que el nitrógeno combinado no produce la respuesta descrita anteriormente en las semillas. Semu y Hume (1979) sugieren que la fijación de nitrógeno atmosférico puede producir la cosecha máxima. Por tanto, habría de potenciarse al máximo la fijación más que confiar en la fertilización nitrogenada.

También se cuestiona si el incremento del contenido de nitrógeno en los tejidos vegetales se correlaciona con el rendimiento del cultivo. Haque et al. (1980) demostraron que existe una correlación positiva entre estos dos parámetros. Sin embargo, Rabie et al. (1979) informaron que el nitrógeno contenido en los órganos vegetativos es un pobre indicador de la cosecha final.

Las discrepancias de los resultados expuestos podrían ser debidas, bien a la variabilidad del nitrógeno disponible en el suelo o bien a la incapacidad de las leguminosas para utilizar convenientemente el nitrógeno aplicado.

3.3.7.3.- Efecto del Tiempo de Aplicación del Nitrógeno.

Parte del nitrógeno de que dispone la planta en un suelo procede de los residuos orgánicos que pueden variar con el suelo y con la estación. Este nitrógeno puede estar presente al inicio del periodo de crecimiento y distribuido a lo largo de todo el perfil del suelo. Además, la planta puede disponer del nitrógeno como fertilizante, que se debe - adicionar cuando la absorción de nitrógeno sea máxima. En general los cultivos requieren el nitrógeno en la fase de crecimiento rápida (Tinker, 1979) y en el caso de cultivos continuados, que tengan más de una recogida, deben recibir - nitrógeno periódicamente.

Las leguminosas dependen del suministro de nitrógeno, antes de que se inicie la fijación biológica, para mantener sus requerimientos en nitrógeno, particularmente en - suelos que contienen un nivel bajo de nitrógeno disponible (West et al., 1980). Sin embargo, los resultados obtenidos por Semu y Hume (1979) evidencian que la aplicación inicial de nitrógeno no puede aumentar la producción de semillas de soja.

Por otra parte, se ha informado que el nitrógeno - suministrado a la planta durante el periodo de floración y en el llenado de la vaina tiene una gran importancia en la producción de una alta cosecha (Brevedan et al., 1978). El efecto positivo de la aplicación de nitrógeno en la floración y al inicio del llenado de la vaina mitiga el aborto de los frutos. Brevedan et al. (1978) encontraron que además de aumentar la cosecha, el nivel de abortos de las flores de - creció en un 10 % respecto a los controles.

Con objeto de detectar el significado de la fertilización nitrogenada durante la floración y el llenado de la vaina, en el crecimiento y producción de la planta, se sometieron plantas de soja sin nodular a una deficiencia de nitrógeno hacia el final de la floración durante la formación de la vaina y la formación de la semilla. El stress de nitrógeno durante la formación de la semilla, no afectó al crecimiento vegetativo, al contenido de nitrógeno o a los componentes de la cosecha (nº de vainas y semillas por planta) sólo afectó al peso individual de la semilla y a su concentración de nitrógeno. En cambio el stress de nitrógeno al final de la floración o durante la formación de la vaina, produce una reducción, de las vainas, del número de semillas, del peso de las semillas y del nitrógeno contenido en semillas y en órganos vegetativos (Streeter, 1978).

Hanway (1975) describe lo que ocurre durante el "pod-filling". La semilla se llena constituyendo un sumidero de carbohidratos, producidos por las hojas. El nivel de carbohidratos solubles en tallo y raíz disminuye. Los nódulos dejan de fijar nitrógeno y se inicia su senescencia. El crecimiento de la raíz y la absorción de nutrientes se detienen. Por ello, Garcia y Hanway (1976), aconsejan una fertilización foliar de nitrógeno, fósforo y azufre en ese momento para evitar que decaiga el nivel de nutrientes y de fotosintato en hojas. La fertilización azufrada por vía foliar ha sido aconsejada en leguminosas de grano (Lluch et al., 1976).

En leguminosas grano parece ser que el momento de aplicación de la fertilización nitrogenada es durante la implantación de las vainas (Vasilas et al., 1980). En cambio en leguminosas forrajeras el nitrógeno se aplica en los primeros momentos tras la germinación cuando la planta no posee aún nódulos, con objeto de provocar un mejor establecimiento de la planta.

3.3.7.4.- Formas de Nitrógeno.

Muchos de los informes controvertidos encontrados en la bibliografía relativos a la respuesta de las leguminosas a la fertilización nitrogenada, pueden ser parcialmente atribuidos a la forma de utilizar el nitrógeno en los distintos experimentos (Sasseville y Mills, 1979).

Las formas de nitrógeno más usuales son el nitrato y el amonio. Es interesante señalar que se comportan de distinta forma en el suelo y también van a tener efectos distintos en la fisiología de la planta, a causa de las características y propiedades inherentes de los dos iones. Estas características son : a) El amonio es un catión y el nitrato un anión, por lo que en un medio cargado negativamente, como es el suelo, el amonio queda unido a los coloides del suelo y el nitrato queda libre, b) La aplicación de una u otra forma de nitrógeno como fertilizante condiciona la adición de distintos iones acompañantes, c) Cuando el amonio lo absorben las plantas se tiende a acidificar el medio, mientras que la absorción de nitratos crea un medio alcalino. Estos cambios de pH no sólo afectan la absorción de ambos, sino que producen interacciones con otros iones y componentes del medio (Hageman, 1980).

Si tuvieramos que cuestionar que forma de nitrógeno, nitrato o amonio, es mejor para obtener una buena productividad, tendríamos que poner de manifiesto lo que dice Hageman (1980), "There is nothing new under the sun" y estimar que la conclusión a la que llegó en 1937 Arnon, "tanto el nitrato como el amonio pueden servir como fuente adecuada de nitrógeno para el crecimiento de la planta, pero generalmente los nitratos se consideran mejores fertilizantes", se considera actualmente válida. Esto es verdad cuando el cultivo se lleva a cabo bajo condiciones controladas, sin embargo, en condiciones de campo, la cuestión anterior es difícil de resolver a causa de la dinámica natural del suelo (Hewitt y Smith, 1975).

En cultivos hidropónicos se ha podido estudiar más profundamente el efecto del nitrato y del amonio. Michael et al. (1970), trabajando con nitrógeno marcado, encontraron que distintas especies vegetales absorbieron el nitrato y el amonio en proporciones diferentes a partir de una solución de nitrato amónico. Ellos sugirieron que la desigual absorción de las dos formas de nitrógeno puede estar relacionada con el suministro de carbohidratos y con la edad de la planta.

Es difícil sumarizar los factores que afectan la absorción de amonio y nitrato, pero los más importantes son el estado de desarrollo de la planta, su nivel de nitrógeno, la temperatura, el pH y además cuando se trata del suelo aparecen otros factores adicionales (Riley y Barber, 1971).

La utilización del nitrato y el amonio como fertilizantes nitrogenados puede afectar a procesos metabólicos de la planta como la absorción de iones y el metabolismo de los carbohidratos.

Las plantas que crecen en un medio con nitratos acumulan más cationes (Mg^{++} , K^+ y Ca^{++}), ácidos orgánicos - (malato, citrato, etc.) y peso seco que las plantas que crecen en un medio con amonio (Barker y Maynard, 1972; Pill y Lambert, 1977). En contrapartida, las plantas que crecen en un medio amoniaco tienen más sulfatos y fosfatos, que los que crecen en un medio con nitratos.

La razón por la cual la concentración de cationes, encontrados en plantas crecidas con amonio, disminuye con respecto a los que crecen en un medio con nitratos, parece ser debido a la competencia por los sitios de absorción. Hay autores que piensan que si el nitrato se reduce en la raíz éste no puede servir como ion acompañante para el transporte de cationes al tallo (Coic et al., 1970) y según esto sería difícil explicar el acúmulo de cationes por efecto del nitrato.

La razón por la cual existe un bajo nivel de ácidos orgánicos en plantas cultivadas con amonio es compleja. Puede ocurrir que el amonio necesite combinarse, ya que es tóxico, con cetoácidos y aminoácidos para formar aminoácidos o aminas respectivamente. De cualquier forma, la carencia de ácidos orgánicos induce la creación de potenciales peligrosos para el metabolismo de las plantas y afecta la operatividad del ciclo de Krebs. La razón por la cual las plantas que crecen en un medio con nitratos, presentan un nivel alto de ácidos orgánicos, puede relacionarse con el hecho de que el nitrógeno de los nitratos puede aceptar ocho electrones y actuar como agente oxidante (Arnon, 1937). El oxígeno del nitrato es más efectivo como oxidante que el oxígeno del agua. La reducción de nitratos puede acoplarse al ciclo de Krebs y estimular la síntesis de ácidos orgánicos (Sawhaney et al., 1978).

Otro aspecto que conlleva el uso de nitratos o amonio, son las variaciones provocadas en el pH interno de la planta y las distintas respuestas (eflujo de OH^- , absorción de protones, catabolismo de ácidos orgánicos, etc.) de la planta para mantener la neutralidad eléctrica de cargas (Ben nett, 1971). Sin embargo, las consecuencias metabólicas de estas alteraciones en el pH interno no se conocen.

Las plantas que crecen con amonio tienen altos niveles de glucosa que provienen del fotosintato y no de la degradación de almidón. La principal causa de la acumulación de glucosa puede ser la inhibición de la síntesis de almi dón. También se ha observado que el amonio provoca una inhibición de algunos enzimas de la glucolisis evitando el flujo de glucosa a piruvato y por tanto deteniendo la actividad del ciclo de Krebs. Esto está de acuerdo con los bajos niveles de ácidos orgánicos y carbohidratos detectados en plantas crecidas en altos niveles de amonio (Hageman, 1980).

Las leguminosas tienden a preferir los nitratos al amonio (Rabie, 1981). Sasseville y Mills (1979), estudiando

las respuestas del guisante a diferentes relaciones $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, determinaron que el factor más influyente en la cosecha es el nitrato disponible más que el nitrógeno total aplicado. Cuando la forma predominante de nitrógeno es amoniacal, se requiere un mayor suministro de nitrógeno para producir una cosecha comparable a la obtenida con menores dosis de nitrógeno si la forma predominante de nitrógeno son los nitratos. La fijación de nitrógeno resultó más afectada por los nitratos que por el amonio, pero el efecto tan negativo que ejerce el amonio sobre la fotosíntesis, induce a las leguminosas a preferir los nitratos al amonio.

Gauch (1972) indica cuatro ventajas de la utilización del nitrato sobre la del amonio : a) El nitrato puede ser almacenado en varios órganos sin provocar una toxicidad aparente, b) La asimilación de nitratos está coordinada y regulada con el metabolismo del carbono, requiere NADH, que se produce en la oxidación de los ácidos orgánicos. Estos podrían asegurar un adecuado suministro de esqueletos carbonados para la producción de aminoácidos, c) El metabolismo del nitrato es catalizado por la nitrato reductasa, que es más sensible al calor y a la sequedad que la mayoría de los enzimas del aparato fotosintético, d) En hojas la asimilación del nitrato es muy lenta, sobre todo en oscuridad.

Estos diversos mecanismos de regulación aseguran que el nitrato no se transforme en amonio, cuando las plantas sean deficientes en esqueletos carbonados o cuando tengan unos requerimientos mínimos de nitrógeno.

Otra forma de suministrar el nitrógeno a los cultivos es la urea, compuesto con alto contenido en nitrógeno soluble, cuya hidrólisis enzimática a carbonato amónico, es muy rápida en casi todos los suelos. Sin embargo, no hay que olvidar que existen numerosos inhibidores de la ureasa (Mulaney y Bremner, 1978). En cultivos hidropónicos, Vigue et al. (1977) concluyen que la urea es más conveniente que el nitrato para obtener plantas de soja vigorosamente nodula -

das y capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. No obstante, Ham et al. (1975) no observan diferencias entre las distintas formas de nitrógeno utilizado.

De todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que la forma preferente de nitrógeno para la nutrición de leguminosas seguiría el siguiente orden : urea > nitratos > amonio. No obstante, la confirmación de esta hipótesis requiere más investigaciones.

Se ha potenciado el uso de fertilizantes que libe-
ran lentamente el nitrógeno con objeto de reducir las pérdidas por lixiviación de los fertilizantes solubles y suministrar así una fuente de nitrógeno más constante. La disponibilidad de estas formas retardadas de nitrógeno depende de las condiciones físico-químicas del suelo, de su actividad biológica y de la temperatura. Sin embargo, el nitrógeno recuperado, determinado por la proporción de nitrógeno absorbido por el cultivo y el nitrógeno total aplicado, es en el caso de fertilizantes nitrogenados de lenta liberación, bastante escaso, si lo comparamos con los convencionales fertilizantes nitrogenados solubles. Cooke (1972) sugiere que "los mejores resultados se han obtenido con los fertilizantes inorgánicos clásicos, utilizados en el momento y a la dosis adecuada. Los fertilizantes que actúan lentamente tienen la desventaja de que una vez aplicados, el suministro de nitrógeno al suelo no puede ser controlado e inevitablemente dependerá, de alguna forma, del tiempo".

Eficiencia del uso del nitrógeno

El uso eficiente del fertilizante nitrogenado es normalmente una preocupación de la investigación agrícola puesto que generalmente, alrededor del 50% del nitrógeno aplicado se encuentra en las partes del cultivo recolectadas. El resto es una pérdida económica y puede ser un peligro potencial si el nitrógeno llega como nitratos a las aguas po-

tables (Tinker, 1979). La organización mundial de la salud sólo acepta límites por debajo de 11,4 ppm de nitratos.

El método más directo para determinar la eficiencia del fertilizante es comparar el nitrógeno adicionado al cultivo con el nitrógeno total del mismo. De esta forma Johnston (1976) determina que la eficiencia en cereales es del orden del 50 - 70 %. Los pastos tienen una mayor eficiencia, absorbiendo cerca del 100 %. Las patatas y remolachas tienen una recuperación baja. En las leguminosas, la recuperación del nitrógeno puede ser mayor que lo estimado debido a la fijación simbiótica de nitrógeno. En cualquier caso Johnston (1976) sugiere que la eficiencia disminuye marcadamente con la dosis de fertilizantes.

Olson (1979) indica que el nitrógeno marcado suministra el único método correcto para determinar la eficiencia en su utilización. Las primeras experiencias con nitrógeno marcado las realizó Bartholomew et al. (1950) y en ellas, demostró que poco o nada del fertilizante se pierde de la zona radical si la proporción aplicada no excede de la requerida para la máxima cosecha. Broadbent y Carlton (1978) indicaron el momento en el cual hay que aplicar el fertilizante y la dosis, para que sea más eficaz, así como el régimen de irrigación. El retrasar la aplicación de fertilizante nitrogenado hasta que el cultivo se ha establecido, proporciona, no sólo una mayor cosecha que cuando se suministra el fertilizante en el momento de la siembra, sino que deja un mayor residuo de nitrógeno para el uso del futuro cultivo.

Un aspecto importante son los residuos vegetales que retornan al suelo y su contenido en nutrientes que podrán ser utilizados por los cultivos sucesivos. Por tanto, la eficiencia del fertilizante debe ser considerada a través de periodos largos de tiempo. En el caso de que se desarrollen cultivos diferentes, puede ser difícil determinar esta eficiencia para cada cultivo por separado, siendo la si

tuación más clara para cultivos que crecen en condiciones similares durante varios años, lo que sólo es posible en algunos cereales y en forrajeras.

Otro proceso que afecta la eficiencia del uso del fertilizante es la lixiviación del nitrato, principalmente, en otoño, aunque también se pierde en primavera, dependiendo del tipo de suelo y de sus características físico-químicas. El amonio se mantiene como catión cambiante y su lixiviación es muy lenta. El único riesgo del amonio es su pérdida por volatilización y esto es importante en suelos ácidos (Addiscott, 1977).

El proceso de desnitrificación puede producir pérdidas del fertilizante nitrogenado. En suelos anaerobios esto es frecuente, por ello se aconseja la fertilización con urea o compuestos amoniacales. Sin embargo, es difícil evaluar las pérdidas por desnitrificación en el campo. Hay estimaciones, realizadas por Burford y Hall (1977), en cultivos de maíz de invierno, cuyas pérdidas de nitrógeno por desnitrificación en relación con el nitrógeno aplicado no son excesivas, en cambio otras apreciaciones indican pérdidas incluidas en un rango del 1 - 40 % del nitrógeno aplicado.

3.4.- Nutrición Azufrada : Azufre en Fisiología.

El azufre es un elemento esencial para la nutrición de las plantas. Generalmente lo utilizan en forma inorgánica en la síntesis de numerosos compuestos azufrados esenciales para la vida. La reducción del sulfato en plantas es un proceso biológico importante puesto que suministra aminoácidos azufrados a aquellos organismos que son incapaces de usar el sulfato como fuente de azufre.

El contenido total de azufre en tejidos vegetales, es del orden del 0,2 - 0,5 %. La principal forma disponible del azufre para las plantas es el sulfato. La mayor parte se incorpora a compuestos orgánicos de la planta tras sufrir un proceso de óxido-reducción, sin embargo, una pequeña parte de los sulfatos se puede incorporar, sin ningún cambio, a distintos compuestos orgánicos. También podemos encontrarlo en el vegetal como tal ion inorgánico, contribuyendo a la regulación osmótica celular (Brunold y Schmidt, 1978).

3.4.1.- Absorción y Acumulación de Azufre.

Las plantas absorben el azufre principalmente como ion sulfato. La absorción no es sensible al pH aunque Hendrix (1967), determinó que en judías el óptimo de absorción se alcanza a un pH de 6,5. Se ha observado que la absorción de sulfatos por las raíces depende de la temperatura y se afecta por los inhibidores respiratorios, los inhibidores de la ATP-asa y los desacopladores (Smith, 1976).

La cinética de absorción del sulfato es muy compleja. Hay autores que determinan que la absorción de sulfatos posee una cinética similar a la de Michaelis-Menten (Smith, 1976). Nissen (1974) postuló que la cinética de absorción, medida en un amplio rango de concentraciones de sulfatos, era multifásica, sin embargo concluyó que la absorción del

sulfato involucra un solo transportador cuya cinética - está controlada por el sulfato exógeno . Las células no fotosintéticas poseen un mecanismo de absorción activa para los sulfatos, que utiliza las oxidaciones respiratorias como fuente de energía.

La absorción del sulfato es poco afectada por otros nutrientes. No obstante el seleniato, ion químicamente relacionado con el sulfato, disminuye la absorción de éste sustancialmente, ello indica que ambos iones compiten por el mismo transportador. A la inversa, el sulfato inhibe la absorción de cromato y seleniato (Ferrari y Renosto, 1972), si bien esta es poco efectiva. Un exceso de nitrato, clorato y fosfato respecto al nivel de sulfato no producen una gran inhibición de la absorción de éste (Smith, 1976). Colectivamente estos datos indican que algunos aniones del grupo VI compiten con el sulfato por el mismo mecanismo de absorción.

Ulrich et al. (1967) estudiando la acumulación del azufre en alfalfa (Medicago sativa) en cultivos hidropónicos, encontraron que cuando los niveles de azufre son limitantes, aumentando las dosis de sulfatos, se eleva el contenido de azufre orgánico sin incrementar el contenido de sulfato. El nivel de azufre orgánico incrementa hasta un nivel determinado, alcanzado éste, el azufre orgánico se mantiene constante y se acumula el sulfato. Esto también se detecta en hojas de girasol cuando se cultivan en niveles crecientes de sulfatos. Estos resultados demuestran que el azufre absorbido en exceso, respecto a las necesidades de la planta para la síntesis de compuestos orgánicos azufrados, se acumula como S-sulfato. No obstante hay especies vegetales, capaces de sintetizar sulfolípidos en los que el azufre se acumula en forma orgánica (Marquard et al., 1968).

3.4.2.- Transporte.

El sulfato es transportado en dirección acrópeta principalmente desde la raíz a través del xilema (Pate , 1965) hasta la hoja, donde es reducido y asimilado en compuestos orgánicos mediante reacciones dependientes de la luz. La capacidad que tienen las plantas superiores para transportar el azufre en dirección basípeta es relativamente es casa. En experimentos realizados por Bouma (1967) con especies de trébol se observó como resultado de la interrupción del suministro de sulfatos a la solución de cultivo, que el azufre de la raíz y peciolos fue transportado hacia las hojas jóvenes, puesto que el azufre de las hojas viejas no se redistribuye en las jóvenes. Esto indica que no existe el - transporte en contra del gradiente de transpiración.

Hay numerosas evidencias que muestran que las plantas pueden utilizar el SO_2 atmosférico como parte del suministro de azufre. Faller et al. (1970) cultivaron diversas especies vegetales en cámaras de cultivo con atmósfera controlada de SO_2 y observaron que el crecimiento se redujo en aquellos tratamientos en los cuales el SO_2 estaba ausente. El efecto beneficioso del SO_2 para mitigar las deficiencias de azufre ha sido informado por muchos autores (Cowling y Locker, 1976). Un efecto semejante produce el azufre elemental en polvo suministrado por vía foliar (Lluch et al., 1976). El azufre elemental se transforma en SO_2 ó SH_2 que será absorbido a través del estoma y distribuido por toda la planta detectándose en fracciones orgánicas e inorgánicas como azufre proteico, azufre-sulfato o aminoácidos azufrados. La dinámica de la absorción de SO_2 y su efecto en la intensi-dad del proceso fotosintético y en la apertura y cierre del estoma ha sido discutida recientemente (Barakhtenova, 1980).

3.4.3.- Metabolismo del Azufre.

a) Funciones del azufre en el vegetal.- Interviene el azufre en numerosos procesos de la nutrición y del metabolismo de la planta, jugando un doble papel de elemento plástico y catalítico.

El azufre entra a formar parte de la cisteína y metionina, aminoácidos esenciales en la construcción de las proteínas. En su ausencia, el nitrógeno se acumula en forma de moléculas solubles como nitrato, amonio y aminoácidos distintos de los azufrados, y la síntesis de proteínas se detiene. De esta forma el azufre se convierte en un factor limitante del desarrollo de la planta cualquiera que sea la cantidad de los otros nutrientes presentes.

Interviene en la formación de enlaces disulfuro entre dos cadenas polipeptídicas, los cuales van a contribuir en el mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas globulares, en la inactivación de enzimas y en el aumento de la polimerización de las proteínas (estructura cuaternaria). Ewart (1978) concluyó que una gran polimerización de la glutelina contribuye a mejorar la calidad del trigo.

A través de estos puentes disulfuro se pueden poner en funcionamiento sistemas re-dox que pueden funcionar como donadores o aceptores de protones. El sistema cisteína/cistina y el glutathion son dos sistemas re-dox que funcionan ampliamente en el vegetal. El grupo SH del ácido lipoi-co también participa en los sistemas re-dox. El ácido lipoi-co es un coenzima involucrado en la descarboxilación oxidativa de los alfa-cetoácidos.

Un grupo importante de compuestos azufrados son las ferredoxinas. Proteínas sulfoférricas no hémicas, de peso molecular bajo, con alto nivel de cisteína y con igual número de átomos de azufre e hierro ligados en su molécula. La disposición espacial de los átomos de S y Fe no se conoce,

sin embargo, parece ser que los átomos de hierro están coor
dinados con los átomos de azufre inorgánico y átomos de azu
fre de la cisteína. Esta configuración le confiere un poten
cial re-dox altamente negativo que es utilizado en el proce
so fotosintético, en la reducción de sulfatos; en la reduc
ción de nitrógeno atmosférico y en la síntesis del glutama
to.

El azufre es constituyente esencial del coenzima-A
y de las vitaminas biotina y tiamina. La biotina está aso -
ciada con la fijación de CO_2 y con las reacciones de descar
boxilación, aunque no parece ser el grupo prostético de las
enzimas de la asimilación del CO_2 . El azufre forma parte del
anillo tiazólico de la tiamina. La tiamina se presenta como
vitamina libre o como tiamina-pirofosfato. En contraste con
los animales, las plantas tienen una gran cantidad de tiami
na libre. Este compuesto actúa como coenzima en la descarbo
xilación del piruvato y en la oxidación de alfacetoácidos.

Los compuestos volátiles de azufre abundan en de -
terminadas especies vegetales. Los sulfoóxidos son responsa
bles del lacrimo que producen las cebollas y del fuerte olor
de los ajos (Mengel y Kirkby 1982).

b) Asimilación del Sulfato .- Los sulfatos, estado
de oxidación +6, que entran en la planta a través de la raíz
deben ser reducidos, como los nitratos y el dióxido de car
bono antes de ingresar en el metabolismo, a compuestos orgá
nicos que contienen el azufre en un estado de oxidación -2
como cisteína, metionina, biotina, glutation, tiamina, áci
do lipoico, etc., aunque el sulfato como tal puede formar
parte de distintos compuestos orgánicos como polisacáridos
esteroides, fenoles, sulfolípidos, etc.

Las raíces parecen tener capacidad para reducir -
sulfatos con destino a sus propias necesidades, por lo que no
transfieren cantidades apreciables de azufre reducido a los
tallos, al contrario de lo que ocurre con los nitratos (Fe-

rrari y Renasto, 1972). Pate (1965) encontró que solo un 0,2 a 0,4 % del azufre marcado con ³⁵S, suministrado por vía radical a las plantas, se encontró como azufre orgánico en el xilema.

La reducción de sulfatos es más importante en los tejidos fotosintéticos, incluso que la reducción de nitratos, puesto que el nivel de nitratos que llega a la hoja respecto al nitrógeno total, es muy variable (Wallace y Pate, 1967). Sin embargo, en tejidos no fotosintéticos la asimilación de sulfatos no es apreciable ya que se transportan a las hojas.

El estudio de la reducción asimiladora de sulfatos ha recibido una atención posterior al de la fijación de dióxido de carbono o a la reducción de nitratos, lo que unido a la diversidad del estado de valencia del azufre y a su facilidad de interconversión química, ha condicionado que el conocimiento actual que tenemos del metabolismo del azufre, sea inferior al que tenemos sobre la asimilación de nitratos y/o la asimilación del CO₂. No obstante, los trabajos de varios equipos de investigación permiten obtener una visión actual bastante completa del proceso (Wilson y Renveny, 1967; Schmidt, 1979).

La reducción del sulfato a sulfuro requiere del aporte de 8 electrones en dos pasos de reacción que utilizan 2 y 6 electrones, respectivamente, al igual que ocurre con la reducción de nitrato, sin embargo el sulfato debe ser activado previamente a su reducción. Se acepta actualmente, que el primer paso de la incorporación del azufre en plantas superiores es la reacción entre el ATP y el sulfato. El grupo sulfuril del SO₄H₂ sustituye al grupo pirofosforil del ATP y forman el adenosín fosfosulfato (APS) o "sulfato activo" (Mengel y Kirkby, 1982). Esta reacción está catalizada por un enzima denominado ATP-sulfurilasa. Siegel (1975) la describe como una reacción endergónica en la cual el APS tiene un potencial re-dox mucho menos negativo que el sulfa

to. La actividad del enzima en tejidos fotosintéticos está relacionada con los cloroplastos. También ha sido detectada en tejidos no fotosintéticos, aunque en este caso su actividad es escasa. Esta observación está de acuerdo con el movimiento del azufre desde la raíz a las hojas en forma de sulfato (Pate, 1965).

El grupo sulfo del APS es transferido a un complejo proteico denominado transportador X-SH en plantas superiores. En este proceso, catalizado por una APS sulfotransferasa, el H del grupo -SH del transportador es reemplazado por el grupo sulfo a través de un enlace tiosulfonato. Se ha propuesto que el transportador X-SH, un tiol de bajo peso molecular, se une al enzima APS-sulfotransferasa que actúa como aceptor del grupo sulfo. Este proceso ocurre en el grana cloroplastidial, donde se ha detectado la ATP-sulfurilasa, APS-sulfotransferasa y la proteína transportadora unida al grupo sulfo (Schwenn y Trebst, 1976).

La tiosulfonato reductasa cataliza la reducción del grupo sulfo a sulfuro, ligado al transportador, utilizando como poder reductor la ferredoxina reducida por la luz. Este enzima también está unido a membranas tilacoidales (Schwenn y Trebst, 1976). El grupo sulfuro unido al transportador se transfiere al O-acetil serina, que es el aceptor fisiológico de sulfuros. Este paso está catalizado por la cisteína sintetasa, aislada en plantas y ampliamente estudiada por Giovanelli *et al.* (1980). La regeneración de la proteína transportadora requiere dos equivalentes de reducción que probablemente los proporciona la ferredoxina o el NADPH.

Se ha propuesto una vía alternativa de reducción del sulfato distinta a la anterior, denominada vía libre o no ligada, debido a la existencia en plantas superiores de una sulfito-reductasa (Sawhney y Nicholas, 1975). Este enzima está asociado al cloroplasto y requiere a la ferredoxina como reductor fisiológico, aunque también puede usar el NADPH.

La asimilación del sulfuro obtenido por la reducción de sulfatos "vía libre" es bastante semejante a como se incorpora el sulfuro obtenido según la vía ligada (Bertagnolli y Wedding, 1977; Anderson, 1980).

La vía de asimilación del sulfato a través de la sulfito reductasa es importante para explicar la asimilación del sulfito exógeno. También podría explicar la asimilación del azufre que penetra por vía foliar, bien en forma de azufre elemental o como SO_2 y SH_2 procedente de la atmósfera. El SO_2 puede mitigar el stress de azufre en plantas que crecen en suelos deficientes en azufre, siendo presumiblemente asimilado a través de la vía no ligada (Cowling y Lockyer, 1976). Sin embargo, puesto que estas son condiciones anormales de crecimiento en plantas, se ha sugerido que la función de la sulfito-reductasa podría ser eliminar el sulfito libre que se puede producir por reacciones metabólicas descontroladas del tipo de las que describe Tsang y Schiff (1976).

c) Requerimientos de Azufre por los cultivos .-

Las plantas cultivadas pueden dividirse según sus requerimientos de azufre en tres categorías (Jordan y Ensminger, 1958).

1) Cultivos que necesitan grandes cantidades de azufre. Tienen un periodo de crecimiento relativamente corto y de ahí que el suministro de azufre sea especialmente importante. Pertenecen a este grupo las crucíferas que tienen gran cantidad de heterósidos azufrados, compuestos organoazufrados volátiles y flavonoides.

2) Con unas necesidades intermedias se encuentran las leguminosas, plantas con una proteínosíntesis elevada. Además pertenecen a este grupo las Quenopodiáceas y las Umbelíferas entre otras.

3) Plantas que tienen unas necesidades muy reducidas de azufre. En este grupo se incluyen los cereales, que son poco exigentes en azufre, en particular cuando el cultivo se desarrolla con niveles moderados de nitrógeno.

3.4.4.- Deficiencia de Azufre.

Las plantas sometidas a una deficiencia de azufre sufren una detención del crecimiento (Wooding et al., 1971). Generalmente su influencia es mayor sobre el crecimiento del tallo que sobre el de la raíz. El tallo se torna rígido, delgado y frágil, las hojas son más pequeñas y estrechas y la longitud de los entrenudos se acorta (Mengel y Kirkby, 1982). Efectos semejantes han sido descritos por Campos et al. (1982) en Phaseolus vulgaris L.

Otros efectos observados en el crecimiento son : muerte de la yema terminal del tallo, desarrollo prematuro de las yemas laterales, en las cuales se forman pequeñas hojas enrolladas y producen múltiples ramas con yemas terminales muertas, y una severa y rápida defoliación.

Se altera la formación del cloroplasto y su composición puede ocurrir de forma drástica. La clorosis se presenta primero en hojas jóvenes. Esto demuestra que los tejidos viejos no pueden contribuir sustancialmente al suministro de azufre para las hojas jóvenes, lo cual obviamente nos indica la poca movilidad del azufre en las plantas (Maynard, 1979).

Ulrich et al. (1967) describen las deficiencias de azufre en alfalfa como sigue : "Las deficiencias de azufre aparecen en la zona apical. Las hojas se tornan de un verde brillante a amarillo y con el tiempo todas las hojas de la planta se vuelven amarillas". Este desarrollo de la clorosis de azufre observada en la alfalfa es semejante para - otras especies.

La deficiencia de azufre provoca alteraciones en diferentes aspectos bioquímicos. Se ha observado una inhibición de la proteínosíntesis, acumulándose los aminoácidos no azufrados, preferentemente glutamina, asparagina y arginina (Eppendorfer, 1968).

Otro síndrome bioquímico de la deficiencia de azufre es un nivel bajo de carbohidratos, debido a una inhibición de la fotosíntesis (Chen, 1967). En esta línea están los trabajos de Rendig et al. (1976) que observaron la acumulación de nitrógeno amido, en plantas deficientes en azufre, asociada con niveles bajos de azúcares como resultado de la pobre actividad fotosintética en plantas cloróticas. Ergle y Eaton (1951), han resumido la influencia de la deficiencia de azufre sobre las distintas fracciones nitrogenadas y azufradas, así como sobre el nivel de carbohidratos en el vegetal.

Otra consecuencia de la deficiencia de azufre es la acumulación de nitratos. Esta acumulación puede depender de la disponibilidad del azufre del suelo (Triboi-Blondel, 1979). Cuando la fertilización azufrada es la adecuada, el nitrógeno en forma de nitratos no se acumula (Arora y Luthra, 1971), por lo que el azufre podría afectar el normal funcionamiento de la nitrato reductasa. Las plantas deficientes en azufre tienen una actividad nitrato-reductasa menor que las plantas controles (Ergle y Eaton, 1951).

El contenido en clorofila disminuye ante una deficiencia de azufre y la estructura del cloroplasto se altera. Sin embargo, otros autores encuentran que no hay alteraciones de los cloroplastos aún cuando disminuye la clorofila. Las severas deficiencias de azufre producen un aumento de la resistencia del estoma a la difusión del CO_2 y por ello, se afecta la fotosíntesis neta (Vesk et al., 1966).



3.4.5.- Toxicidad del Azufre.

Las plantas son bastante insensibles a niveles altos de sulfatos en el medio de cultivo. Sólo en el caso de que la concentración sea muy alta, del orden de 50 mM, y en suelos salinos, el crecimiento de la planta puede verse afectado negativamente. Los síntomas visuales detectados son la reducción del crecimiento y el color verde intenso u oscuro de las hojas. Estos síntomas son más específicos de la toxicidad producida por un exceso de sales que por un exceso de sulfatos (Meiri et al., 1971).

Un nivel de dióxido de azufre en la atmósfera, comprendido entre 0,5 y 0,7 mg /m³ puede producir efectos tóxicos en las plantas. El síntoma más espectacular son las manchas necróticas en las hojas. Las causas de la toxicidad del gas han sido investigadas por Silvius et al. (1975). El dióxido de azufre absorbido por las hojas se disuelve con la humedad de la superficie interna de la cámara subestomática tapizada por las células del mesófilo, el resultado es que el ácido sulfuroso se disocia dando SO_3H^- , H^+ y $\text{SO}_3^{=}$. De estos estudios, Silvius et al. (1975) deducen que la toxicidad producida por los altos niveles de SO_2 es debida a los aniones $\text{SO}_3^{=}$ y SO_3H^- que pueden acumularse y desacoplar la fotofosforilación o alterar las membranas del cloroplasto.

3.4.6.- El Azufre como Fertilizante.

Balance de azufre

Aunque el contenido de azufre en plantas cultivadas es del mismo orden que el de fósforo, la aplicación de azufre no es tan importante como la aplicación de fósforo, puesto que el azufre, en forma de sulfato no está tan fuertemente fijado a las partículas del suelo como el fosfato y por tanto es mayor su disponibilidad para las raíces de las plantas. Además el cultivo puede absorber el azufre atmosférico

rico y el azufre suministrado como elemento que acompaña a la mayoría de los fertilizantes.

La cantidad de azufre atmosférico que absorbe un cultivo, depende del nivel de dióxido de azufre en la atmósfera y de la lluvia que favorece la fijación del mismo en el suelo donde será oxidado a sulfato, por esto es frecuente que las zonas cercanas al mar sean ricas en azufre. Realmente el azufre atmosférico no es despreciable en algunos casos. Riehm y Quellmalz (1959) informan que en determinadas condiciones el azufre procedente de la atmósfera es suficiente para suministrar los requerimientos de azufre de un cultivo.

Por otra parte, el sulfato puede ser perdido por lixiviación o lavado, pudiendo presentar el cultivo después de la lluvia, un balance negativo de azufre. Además actualmente la polución atmosférica en dióxido de azufre está siendo controlada y por ello el azufre atmosférico disponible para el cultivo se reduce. La situación se agrava por el hecho de que el consumo de fertilizantes que contienen sulfatos también disminuye. Todo ello ha conducido a que en muchos suelos de cultivo el balance de azufre sea negativo (Mengel y Kirkby, 1982).

Aplicación de azufre

Las deficiencias de azufre han sido reconocidas en distintas partes del mundo (Spencer et al., 1978). Entre las posibles razones que han inducido a ello, se podría señalar el incremento de fertilizantes de alta graduación con bajo contenido en azufre como impurezas, la protección del ambiente, que ha restringido el nivel de SO_2 en la atmósfera procedente de procesos industriales, y la conciencia de la importancia del azufre como nutriente de las plantas. Es por ello que la aplicación del azufre como fertilizante está siendo una práctica usual. En sistemas de pastos la mejor forma para obtener incrementos en la producción anual por uni-

dad de área de cultivo, es mejorar la producción y calidad del forraje mediante el uso de fertilizantes. Sin embargo, el elevado costo y el amplio rango de fertilizantes disponibles impone que en cada momento se utilice el más adecuado y de la forma más eficiente. El mayor número de investigaciones, sobre el uso de fertilizantes se realiza en cultivos anuales, donde la demanda de éstos se produce durante una determinada época del año. Sin embargo, los forrajes y pastos requieren una entrada de nutrientes constante y es importante que los nutrientes que lleva el fertilizante se liberen lentamente (Till, 1978).

La alfalfa es un cultivo que responde al azufre en suelos deficientes en este elemento. En zonas donde la disponibilidad del azufre es moderadamente buena, no hay respuesta a la aplicación de azufre por parte del cultivo, sin embargo, si el cultivo se intensifica utilizando variedades más productivas y llegando hasta la producción de semillas, será necesario aplicar azufre puesto que bajo estas condiciones los requerimientos de azufre, por el cultivo, exceden las disponibilidades del suelo. La extensión en la cual varios cultivos responden a la aplicación de fertilizantes azufrados, depende del grado de deficiencia del suelo (Sudhakar y Mehta, 1970). Estos autores señalan que el valor exacto del azufre en el suelo, por debajo del cual responde una planta a una fertilización azufrada, no es posible encontrarlo en la literatura, por ello aconseja el uso de la relación N/S en plantas para suministrar la adecuada fertilización azufrada.

En suelos deficientes en azufre se ha observado la competencia por el azufre entre el trébol y las gramíneas. En los tratamientos sin azufre, todo el sulfato disponible fue absorbido por las gramíneas y la fijación de nitrógeno, por el trébol, fue insignificante. Con un adecuado diseño de fertilización azufrada y nitrogenada se consigue incrementar favorablemente la cosecha (Lluch et al., 1983.) . Al

aumentar las dosis de azufre, se estimula la absorción de nitrógeno por las plantas, siendo tres veces mayor que la concentración de nitrógeno aplicado como fertilizante. Estas - experiencias demuestran que el azufre es esencial para promover el crecimiento y para la fijación de nitrógeno en las leguminosas (Lluch et al., 1976; 1979).

La soja se ve afectada por el nivel de azufre del suelo. Cuando el azufre llega a ser limitante, podría presentarse un cambio en la cantidad o calidad de proteínas en las semillas. Hay informes de que la fertilización azufrada incrementa la cisteína y la metionina en la semilla. Brown et al. (1981) señalan que si el azufre en el suelo es suficiente, la adición de un fertilizante azufrado no aumenta la cosecha, la concentración de lípidos, los aminoácidos esenciales ni el nivel de azufre en la semilla.

Los fertilizantes azufrados más importantes son : el yeso, el sulfato potásico, el sulfato amónico y el sulfato de potasio-magnesio. También es interesante el uso de - fertilizantes de lenta liberación o de liberación controlada. Hay fertilizantes cuyos gránulos están recubiertos de una película de azufre "sulfur-coated", con objeto de liberar lentamente los nutrientes para las plantas, aunque en muchas ocasiones el objetivo no se logra.

3.5.- Relación Nitrógeno Azufre

En el sistema suelo-planta, es necesario un adecudo balance entre el nitrógeno y el azufre, puesto que existen procesos que muestran una estrecha correlación entre estos nutrientes, tales como : a) La descomposición de residuos vegetales que darán lugar al humus; b) La liberación - de nitrógeno y azufre de la materia orgánica que posterior- mente serán absorbidos por las plantas; c) El uso de estos elementos por las plantas para obtener la máxima calidad de la cosecha (Stewart, 1966).

Bordeleau et al. (1981) fertilizan cultivos de alfalfa con nitrógeno y azufre conjuntamente y encuentra que aumenta la masa radical, la masa aérea y el índice de nodulación. Deducen que ambos elementos parecen tener un efecto multiplicador en los parámetros citados. Esta leguminosa reacciona mejor a la adición de azufre que a la de fósforo y potasio. La nodulación puede favorecerse con una fertilización mixta siempre que el balance sea adecuado (Gates y Müller, 1979).

Las plantas superiores generalmente acumulan nitrógeno y azufre en cantidades proporcionales a las que se incorporan en las proteínas (Rendig et al., 1976). El nitrato se acumula cuando hay deficiencia de azufre y cuando la disponibilidad de nitrógeno esté limitando la proteinosíntesis (Stewart y Porter, 1969). La interacción observada entre la acumulación de nitrógeno y azufre sugiere que la asimilación de nitratos y sulfatos está metabólicamente muy relacionada sin embargo hay poca información al respecto.

En la bibliografía se recogen informes sobre la relación N/S en plantas (Dijkshoorn y Van Wijk, 1967; Stewart, 1966). Esta relación ha sido utilizada para evaluar el status de azufre en la planta.

El sulfato y otros compuestos azufrados no proteicos se almacenan en los tejidos vegetales, cuando el azufre está presente en exceso respecto a los requerimientos de la proteinosíntesis. Es por ello que al comparar la relación N/S total y la relación N/S proteico se puede conocer si el azufre está presente en cantidad adecuada para la formación de proteínas (Dijkshoorn y Van Wijk, 1967). Cuando el suministro de azufre es adecuado la acumulación de azufre no proteico disminuye, siendo la relación N/S total menor que la N/S proteico. Cuando el azufre es deficiente, el nitrógeno no proteico se acumula y la relación N/S total es más alta (Stewart y Porter, 1969).

La relación N/S en brote y en raíz de trigo (Triticum aestivum), maíz (Zea mays) y judías (Phaseolus vulgaris), fué estudiada por Stewart y Porter (1969) en relación con el nitrógeno y azufre suministrado al suelo. En estos estudios se demostró que cuando el azufre es limitante, el suministro de nitrógeno no afectó ni a la cosecha ni al nivel de proteína en plantas, pero el nitrógeno no proteico incrementó. También demostraron que había una estrecha relación entre las cantidades de nitrógeno y de azufre metabolizadas en las plantas. Los datos indicaron que se requiere una parte de azufre por cada 12 ó 15 partes de nitrógeno para asegurar una buena cosecha.

El trabajo de Stewart (1966) con remolacha y trigo sugiere que la relación N/S es una herramienta muy útil para calcular las deficiencias de azufre. Las relaciones N/S para estas plantas fueron bastante similares 15.1 para el trigo y 16.6 para la remolacha. Dijkshoorn y Van Wijk (1967) encontraron una relación N/S de 16.2 para el "ryegrass" (Lolium perenne). Los cálculos hechos por Stewart (1966) sugirieron que la proteína en la alfalfa (Medicago sativa) tiene una relación N/S alrededor de 16 - 17. En este estudio se utilizaron 16 suelos de cultivo y la alfalfa respondió a la fertilización azufrada en 11 de ellos. Cuando no se utiliza fertilización azufrada en estos 11 suelos, el forraje producido tiene una relación N/S mayor que 17. Los cinco suelos en los cuales la alfalfa no responde al azufre, produjeron un forraje cuya relación N/S fue menor de 17. Por lo que se ha sugerido que la relación N/S óptima en estos cultivos es cercana a 16.

Aulakh et al. (1976) estudiaron el efecto del azufre en la relación N/S en alfalfa, observando que las dosis crecientes de azufre provocaban una disminución de la relación N/S total y un aumento de la relación N/S proteico. Para asegurar una máxima cosecha se necesita que por cada parte de azufre existen entre 11 - 12 partes de nitrógeno. Con

la aplicación de azufre se produce un aumento de nitrógeno total, nitrógeno proteico, azufre total, azufre proteico y azufre soluble mientras que las fracciones solubles de nitrógeno disminuyen.

La relación N/S no es recomendable en algunos cultivos. En el caso de la alfalfa la relación N/S varía según la literatura consultada. Pumphrey y Moore (1965) indicaron que el valor óptimo de esta relación es de 11; Jones (1970) obtuvo un valor de 16; Littler y Price (1967) un valor de 14. En el primer trabajo, la concentración máxima de nitrógeno es muy baja, de 2,42. Sin embargo, en otras condiciones los brotes de alfalfa pueden alcanzar niveles de nitrógeno más altos. Por tanto, Andrew (1977) aconseja utilizar como índice de diagnóstico el azufre total, y si se utiliza la relación N/S ha de tenerse en cuenta que la eficiencia de la simbiosis con Rhizobium no está limitada, ni tampoco la disponibilidad del nitrógeno del suelo.

Sin embargo, hay autores que buscan otros índices de diagnóstico distintos a la relación N/S, para conocer el status de azufre de un cultivo.

Andrew (1977) intenta utilizar como índice de diagnóstico las concentraciones críticas de azufre. Los valores se determinan a partir del peso seco de cosecha y la concentración de azufre total en el brote de las plantas. Este método fue utilizado para establecer la concentración crítica de fósforo y de potasio en distintas leguminosas. En un intento de determinar las concentraciones críticas de azufre, en distintas leguminosas tropicales y de zonas templadas, Andrew (1977) obtiene un valor para Medicago sativa de 0,20 %, bastante semejante al valor 0,22 % indicado por otros autores (Pumphrey y Moore, 1967). Littler y Price (1967), sugirieron un valor superior de 0,28 % basándose en la máxima producción proteica, sin embargo, valorando este dato con relación al peso seco nos proporcionan un valor de 0,20 %.

Otro criterio de diagnóstico utilizado ha sido el contenido de azufre-sulfato. Se ha demostrado su acumulación en la planta cuando el azufre está presente en exceso con relación al nivel requerido para la proteínosíntesis. El intento de utilizarlo como criterio de diagnóstico, tanto si se utiliza como valor absoluto, como si se utiliza como porcentaje respecto al S - total, ha sido desestimado. La escasez de datos y la posibilidad de que en la senescencia, como resultado de la proteólisis, el azufre de los aminoácidos se oxide a sulfato, ha condicionado ampliamente que este método de diagnóstico haya sido cuestionado. Por otra parte Smith y Dolby(1977) han demostrado que el contenido de S - sulfato, expresado como porcentaje del azufre total, da una buena indicación del status de azufre en Panicum maximunn. Además Spencer et al. (1978) defienden que este índice es el menos afectado por la edad de la planta, y por el nivel de nitrógeno suministrado, y esto ha sido demostrado en cuatro especies vegetales : trigo, avena, colza y trébol.

Todos los índices para diagnosticar la deficiencia de azufre en plantas, el azufre total, el azufre sulfato, la relación N/S han tenido amplia aceptación y discusión, sin embargo, en cada uno de ellos se ha demostrado alguna imprecisión que impide utilizarlos en un rango amplio de cultivos. El valor crítico de un índice puede variar con la edad de la planta, con el nivel de otro(s) nutriente (s) suministrado(s), o con la parte de la planta analizada (Lluch et al., 1983).

Spencer et al. (1977) realizaron un estudio sobre la eficacia de los tres índices descritos anteriormente en Trifolium subterraneum L. La concentración de S-sulfato tiene la ventaja de que, cuando se pasa de un estado de deficiencia en azufre a un estado de suficiencia, hay un gran cambio en el contenido de sulfato el cual no se observa en el contenido de azufre total. Sin embargo, este índice es muy susceptible a la aplicación de nitrógeno y está marcadamente influenciado por la edad de la planta.

El azufre total es menos susceptible al suministro de nitrógeno y a los órganos vegetales ensayados. La relación N/S ofrece una gran estabilidad con la edad de la planta y con el suministro de nitrógeno. Estas predicciones obtenidas en condiciones de invernadero, fueron confirmadas en condiciones de campo (Spencer, 1978).

La relación N/S en plantas, utilizada como diagnóstico de deficiencia de azufre o de nitrógeno en la planta, variará según el tipo de cultivo. En crucíferas la relación N/S estará relacionada con el contenido óptimo de lípidos y proteínas. La relación N/S variará según las proteínas, en general la relación es del orden de 30/1 a 40/1 (Rendig et al., 1976). Sin embargo, las proteínas de cloroplastos y las nucleoproteínas tienen una relación N/S más baja que las proteínas del grano de trigo, ya que son aquellas más ricas en azufre (Dijkshoorn y Van Wijk, 1967). En las leguminosas, de alto contenido proteico, donde la importancia de la fertilización azufrada y nitrogenada ha sido puesta de manifiesto, esta relación puede ser de una gran utilidad para establecer el adecuado equilibrio entre el nitrógeno y el azufre.

PLANTAS

La planta utilizada en los diferentes experimentos realizados ha sido la alfalfa, Medicago sativa, L. cultivar Aragón. Las mismas provienen de plantas por sus excelentes cualidades como alimento en verde para el ganado. Al mismo tiempo es una planta de fácil cultivo en el laboratorio, que se adapta muy bien para crecer bajo condiciones controladas de cultivo.

Microrrganismos

A lo largo del presente trabajo se ha utilizado un microorganismo Microspora, bacteria que infecta específicamente a la alfalfa y provoca síntomas con ella. La raza de Microspora usada, ha sido la de Microspora de esta raza cultivada en la U.S. de Microbiología en la Estación Experimental del Zoológico, por el Profesor Robert y col.

Método de Cultivo

El método de cultivo utilizado, para la conservación de Microspora en cultivos de alfalfa, fue el método de Allen (1937). La conservación de Microspora se hizo en alfalfa.

IV. MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

Planta

La planta utilizada en los diferentes experimentos realizados ha sido la alfalfa, Medicago sativa, L. cultivar Aragón. Leguminosa forrajera de interés por sus excelentes cualidades como alimento en verde para el ganado. Al mismo tiempo es una planta de fácil manejo en el laboratorio, que se adapta muy bien para crecer bajo condiciones controladas de cultivo.

Microorganismo

A lo largo del presente trabajo se ha utilizado como microorganismo Rhizobium meliloti, bacteria que infecta específicamente a la alfalfa y forma simbiosis con ella. La raza de Rhizobium meliloti usada, ha sido la Rm GR4. Es una raza salvaje aislada en la U.E. de Microbiología en la Estación Experimental del Zaidín, por el Prof. Olivares Pascual y col.

Medio de Cultivo Bacteriano

El medio de cultivo básico utilizado, para la conservación de R. meliloti y para la obtención de inóculos, fue el medio de Allen 79 sólido (Allen, 1957). La composición de este medio es la siguiente:

PO ₄ HK ₂	0.6 g	
SO ₄ Mg·7H ₂ O	0.2 g	
ClNa	0.2 g	
Cl ₂ Ca	0.2 g	(1)
CO ₃ Ca	1.0 g	
Manita	7.6 g	
Glucosa	2.4 g	
Extracto de levadura	0.5 g	
Agar	15.0 g	
Agua	1.0 l.	

pH = 7 - 7,5

(1) El medio original no incluye Cl₂Ca. La cantidad adicionada de este producto sustituye a 2 g de CO₃Ca.

El medio fue esterilizado en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

2.- ESQUEMA DE LOS TRATAMIENTOS.

Se han ensayado tres lotes de tratamientos. En el primer lote, que denominaremos experimentos tipo A, el nitrógeno y el azufre varían simultáneamente. Se ha escogido una combinación de cinco tratamientos a lo largo de los cuales, el nitrógeno y el azufre se modifican dentro de unos niveles bastantes amplios. Obteniéndose un amplio rango de relaciones N/S.

El nitrógeno se suministra como ion nitrato, y el azufre como sulfato. En la tabla 3, se puede observar la composición de las soluciones nutritivas en meq/l de N (como nitratos) y S (como sulfatos), así como la relación N/S, en los distintos tratamientos realizados.

Tabla 3.- Diferentes tratamientos realizados en los experimentos tipo A.

<u>Tratamientos</u>	<u>meq/l</u>		<u>Relación N/S</u>
	<u>NO₃⁻</u>	<u>SO₄⁼</u>	
1	11.32	2.26 5.00
2	8.79	5.50 1.60
3	6.77	8.20 0.80
4	4.56	10.91 0.40
5	2.67	13.33 0.20

En el segundo lote de tratamientos, experimentos tipo B, se ha mantenido constante el nitrógeno a un nivel por debajo del que posee la solución nutritiva standar de Hewitt, mientras que el azufre varía en un rango semejante al utilizado en las experiencias tipo A. La composición en meq/l de N

y S, como nitratos y sulfatos respectivamente, obtenida para cada tratamiento realizado, se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.- Diferentes tratamientos realizados en los experimentos tipo B.

<u>Tratamientos</u>	<u>meq/l</u>		<u>Nivel de azufre</u>
	<u>NO₃⁻</u>	<u>SO₄⁼</u>	
1	3.18	3,18	1 S
2	2.92	6.74	2 S
3	2.73	9.02	3 S
4	2.70	11.80	4 S
5	2.67	14,33	5 S

En el tercer lote de tratamientos, experimentos tipo C, el nivel de azufre, que corresponde al nivel más bajo del primer lote de tratamientos, se mantiene constante y se combina con todos los niveles de nitrógeno de dicho lote. Se han realizado cinco tratamientos en este tipo de experimentos, cada uno de ellos tiene la composición en meq/l de N (nitratos) y de S (sulfatos) que se indica en la tabla 5.

Tabla 5.- Diferentes tratamientos realizados en los experimentos tipo C.

<u>Tratamientos</u>	<u>meq/l</u>		<u>Nivel de nitrógeno</u>
	<u>NO₃⁻</u>	<u>SO₄⁼</u>	
1	11.61	2.32	5 N
2	8.36	2.26	4 N
3	6.78	2.52	3 N
4	5.04	2.75	2 N
5	2.18	3.18	1 N

Los demás macronutrientes, aniones P (PO_4H^-_2) y cationes K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , y micronutrientes se adicionan según Hewitt (1952), manteniéndose constantes a lo largo de todos los experimentos realizados.

3.- SOLUCIONES NUTRITIVAS.

La composición mineral de las soluciones nutritivas de los diferentes experimentos realizados y para cada uno de los tratamientos ensayados se detalla a continuación, expresándose en gramo/litro de solución.

Las diversas soluciones nutritivas se han agrupado según los Tipos de Experimentos expuestos anteriormente.

EXPERIMENTOS TIPO A

<u>TRATAMIENTO 1</u>		<u>TRATAMIENTO 2</u>	
<u>Sales</u>	<u>g/l</u>	<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
$\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$	0.379	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.399
$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.360	$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.633
$(\text{NO}_3)_2 \text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.229	$\text{SO}_4 \text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.525
$\text{SO}_4 \text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.279	ClK	0.082
ClK	0.078	$\text{NO}_3 \text{K}$	0.320
$\text{NO}_3 \text{K}$	0.425	$\text{SO}_4 \text{K}_2$	0.107
KOH^*	1.002 ml	KOH^*	1.054 ml

TRATAMIENTO 3

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.457
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.322
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.547
$Cl_2Ca \cdot 3 \frac{1}{2}H_2O$	0.225
ClK	0.069
SO_4K_2	0.400
KOH	1.113 ml

TRATAMIENTO 4

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.432
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.304
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.569
$Cl_2Ca \cdot 3 \frac{1}{2}H_2O$	0.219
SO_4K_2	0.519
$SO_4Ca \cdot 2H_2O$	0.028
KOH	1.141 ml

TRATAMIENTO 5

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.446
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.315
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.588
ClK	0.092
SO_4K_2	0.430
$SO_4Ca \cdot 2H_2O$	0.312
KOH	1.182 ml

TESTIGO

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.440
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.585
ClK	0.362
SO_4K_2	0.094
$SO_4Ca \cdot 2H_2O$	0.542
KOH	1.162 ml

EXPERIMENTOS TIPO C

TRATAMIENTO 1

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.379
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.360
$(NO_3)_2Mg \cdot 6H_2O$	0.229
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.279
ClK	0.078
NO_3K	0.425
KOH	1.002 ml

TRATAMIENTO 2

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.379
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.631
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.279
$(NO_3)_2Mg \cdot 6H_2O$	0.229
NO_3K	0.124
ClK	0.299
KOH	1.003 ml

TRATAMIENTO 3

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.415
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.690
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.547
ClK	0.085
NO_3K	0.084
SO_4K_2	0.328
KOH	1.099 ml

TRATAMIENTO 4

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.432
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.539
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.569
ClK	0.089
SO_4K_2	0.416
$SO_4Ca \cdot 2H_2O$	0.130
KOH	1.142 ml

TRATAMIENTO 5

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.446
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.315
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.588
ClK	0.092
SO_4K_2	0.430
$SO_4Ca \cdot 2H_2O$	0.312
KOH	1.182ml

TESTIGO

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.440
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.585
ClK	0.362
SO_4K_2	0.094
$SO_4Ca \cdot 2H_2O$	0.542
KOH	1.162 ml

EXPERIMENTOS TIPO B

TRATAMIENTO 1

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.500
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	0.376
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.392
$Cl_2Ca \cdot 3 \frac{1}{2}H_2O$	0.158
$Cl_2Mg \cdot 6H_2O$	0.101
ClK	0.267
KOH	1.145 ml

TRATAMIENTO 2

<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
PO_4H_2K	0.489
$(NO_3)Ca \cdot 4H_2O$	0.345
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	0.527
$Cl_2Ca \cdot 3 \frac{1}{2}H_2O$	0.192
ClK	0.195
SO_4K_2	0.215
KOH	1.073 ml

<u>TRATAMIENTO 3</u>		<u>TRATAMIENTO 4</u>	
<u>Sales</u>	<u>g/l</u>	<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.475	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.500
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.633	$(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.595
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.310	$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.351
$(\text{NO}_3)_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.182	$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 3 \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	0.023
$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.019	$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.138
ClK	0.332	ClK	0.300
KOH	1.130 ml	KOH	1.139 ml
<u>TRATAMIENTO 5</u>		<u>TESTIGO</u>	
<u>Sales</u>	<u>g/l</u>	<u>Sales</u>	<u>g/l</u>
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.500	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.440
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.376	$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.585
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.392	ClK	0.365
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 3 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$	0.158	SO_4K_2	0.094
$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.101	$\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.542
ClK	0.267	KOH	1.162 ml
KOH	1.145 ml		

* El hidróxido potásico se suministra en forma de solución 1N.

Todos los reactivos utilizados fueron productos "Probus" de la calidad "químicamente puro" y "Reactivo analisis" que se disolvían en agua desmineralizada de resistividad comprendida entre 20 y 0,5 megaohmios/cm/cm².

Las soluciones nutritivas fueron equilibradas y ajustadas según el método propuesto por Steiner (1961) con pequeñas modificaciones, de acuerdo con nuestras necesidades, presentando las siguientes características :

Relación aniones/cationes \simeq 1.0

Presión osmótica \simeq 0.71 atmosfera

pH = 6.5 ± 0.1

Los micronutrientes de las soluciones nutritivas se adicionaron del siguiente modo: Fe (EDDHDA Secuestrene 138 Fe, 25 mg/1); Mo ($\text{Mo}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4mg/1) siendo los demás micronutrientes Zn, Cu, B y Mn suministrados según Hewitt (1952).

Como testigo se utiliza la solución nutritiva que proponen Rigaud y Puppo (1975) muy utilizada en estudios de fijación de nitrógeno, puesto que no lleva nitrógeno, convenientemente modificada y ajustada según el método anteriormente citado.

4.- CONDICIONES AMBIENTALES DE LA CAMARA DE CULTIVO.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en cámara de cultivo con las siguientes condiciones ambientales ;

. Fotoperiodo : 16 horas luz/8 horas oscuridad

. Temperatura : día $25 \pm 1^\circ\text{C}$
noche $18 \pm 1^\circ\text{C}$

. Humedad relativa : día $65 \pm 2\%$
noche $80 \pm 2\%$

. Fuente de luz : Fluorescentes Phillips
: Lámparas incandescentes Cool Bean
Par 38

La intensidad luminosa en la superficie de las macetas era de 16.000 lux/m^2 .

5.- EXPERIMENTOS REALIZADOS.

5.1.- Experimentos de Cultivos Hidropónicos en Tubo de Ensayo.

Este tipo de cultivos axénicos en medio líquido para las plantas de alfalfa o de similares características, presenta grandes ventajas que hacen interesante su utilización. Además de permitir que el cultivo se desarrolle en condiciones de total esterilidad, se puede seguir un control detallado y perfecto de toda la formación de los nódulos que es una etapa crítica de la simbiosis Rhizobium-Leguminosa. Presenta como inconveniente la limitación del volumen de cultivo, sin embargo en estos cultivos se producen las etapas típicas de crecimiento, estabilización y madurez o senescencia, comunes a cualquier otro cultivo.

5.1.1.- Esterilización y Germinación de las Semillas.

Las semillas de alfalfa son esterilizadas en superficie con una solución de Cl_2Hg al 2.5 % durante 12 minutos. A continuación son varias veces lavadas con agua estéril dejándolas después en imbibición durante 2 horas a 30°C.

Transcurrido este tiempo las semillas se ponen estérilmente en placas de Petri provistas de disco de papel de filtro y 3 ml de agua estéril. En cada placa las semillas se esparcen uniformemente y a continuación se llevan a estufa a 28°C durante 48 horas, reponiendo el agua cuando sea necesario. Al cabo de este tiempo las plántulas tienen el tamaño adecuado para ser puestas en los tubos de cultivo.

5.1.2.- Preparación de los Inóculos.

La bacteria utilizada en todos los inóculos fue la raza GR4 (Casadesús y Olivares, 1979) de Rhizobium meliloti, aislada en Granada.

El medio de cultivo utilizado para hacer crecer la bacteria fue el medio de Allen 79 sólido. En frascos Roux de 1 l de capacidad, se ponen 100 ml de dicho medio y la cantidad de agar necesaria para que quede al 15%. El frasco tapado con algodón se sometió a un proceso de esterilización en autoclave a 115°C durante 20 minutos. Al salir del autoclave los frascos se agitan y se tienden para que el medio forme una capa uniforme que cubra todo el fondo del frasco y se deja solidificar antes de proceder a su siembra.

La suspensión bacteriana, para la siembra de los frascos Roux, se prepara a partir de un cultivo fresco (72 horas), en tubos de agar inclinados, de R. meliloti. Esta suspensión se reparte homogéneamente por toda la superficie del medio de cultivo contenido en el frasco Roux. Estos se mantienen a 28°C, durante 72 horas, en estufa.

El inóculo utilizado en los cultivos hidropónicos, tanto en tubo de ensayo como en maceta, se prepara a partir de los cultivos bacterianos obtenidos en los frascos Roux. La suspensión bacteriana, obtenida al adicionar agua estéril y bolas de vidrio también estériles para separar el barniz microbiano, se vierte en un matraz estéril que debe ser agitado para obtener una suspensión homogénea. Esta suspensión debe tener una concentración de células de $\approx 10^9$ células/ml.

5.1.3.- Preparación de los Tubos de Cultivo

En tubos de ensayo de 20 x 200 mm se introduce una tira de papel de filtro de 11 x 2 cms. En cada tubo se ponen 10 ml de solución nutritiva mineral y se tapan con algo

dón graso. El conjunto se esteriliza en autoclave a 120°C , durante 20 minutos.

En cada tubo de ensayo, convenientemente rotulado , según tratamientos se colocan 5 semillas de alfalfa, previamente germinadas y desprovistas de episperma, sobre la parte superior de la tira de papel de filtro (Olivares et al., 1980). Las plántulas deben quedar con la radícula orientada hacia el fondo del tubo y paralelas entre sí (figura 7). Los tubos así preparados se mantienen en penumbra de 24 a 48 horas para favorecer el desarrollo de la raíz. Transcurridas las cuales se desechan aquellos tubos, en los que el desarrollo de las 5 plántulas no sea homogéneo. A los tubos en buenas condiciones, se les coloca una funda de papel oscuro que recubre hasta 0.5 cm por encima del papel de filtro, para proteger las raíces de la luz. A continuación los tubos de cultivo se trasladan a la cámara de cultivo donde los tratamientos se distribuyen completamente al azar.

Al cabo de nueve días se vuelven a examinar y se desechan aquellos que no tienen 5 plantas homogéneas, o las que están contaminadas por hongos. Los tubos son inoculados con una suspensión de células de Rhizobium meliloti raza GR⁴ de $\approx 10^9$ células/ml, a razón de 1 ml por tubo. Nuevamente, se trasladan a la cámara de cultivo donde se distribuyen totalmente al azar.

5.1.4.- Diseño Experimental.

Los experimentos de cultivos hidropónicos en tubos de ensayo se realizaron siguiendo los tres tipos de experimentos enmarcados en el esquema de los tratamientos. Cada tipo de experimento consta de 6 tratamientos, de cada uno de los tratamientos se prepararon una serie de tubos de ensayo con plantas en la cual se tuvo en cuenta el material vegetal necesario para las diferentes determinaciones fisiológicas y bioquímicas (actividad nitrogenasa) realizadas a

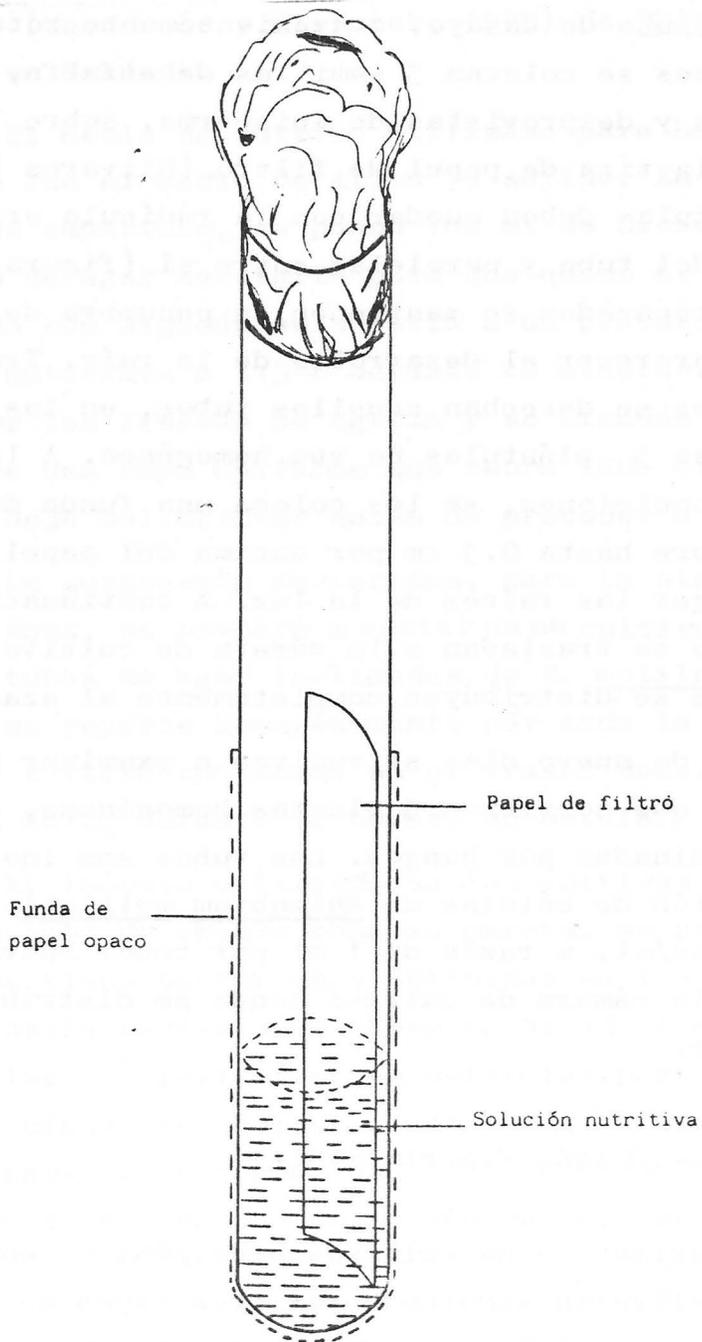


Fig. 7.- Sistema de cultivo hidropónico en tubo de ensayo manteniendo condiciones de esterilidad.

lo largo del periodo de cultivo así como de las repeticio -
nes.

5.1.5.- Determinaciones Realizadas.

A) Desprendimiento de etileno

Se ha seguido el desprendimiento de etileno por -
las raíces de alfalfa inoculadas, durante un periodo que con-
sideramos crítico en la formación del nódulo, desde que se
inocula hasta que el número de nódulos se estabiliza. Estas me-
didas se han llevado a cabo únicamente en los experimentos ti-
po A. Las medidas empiezan un día antes de la inoculación bac-
teriana y se realizan cada 48 horas en los tratamientos si-
guientes: Testigo, tratamiento 3, tratamiento 4 y tratamiento
5. En los tratamientos 1 y 2 las determinaciones de etileno,
se llevaron a cabo cada 72 horas, puesto que en experiencias
previas se había puesto de manifiesto que el proceso de nodu-
lación se retrasa respecto a los tratamientos que tienen me-
nos nitrógeno.

De cada tratamiento se tomaron 5 repeticiones (1 re-
petición/ 2 tubos de cultivos/10 plantas) y se hicieron 9 de-
terminaciones a lo largo del tiempo de cultivo.

B) Determinación de la actividad nitrogenasa espe- cífica.

Se ha determinado la curva de efectividad de los -
nódulos o perfil de la fijación de nitrógeno en los tres ti-
pos de experimentos expuestos, Tipo A, B y C.

En los Experimentos tipo A la medida de la activi-
dad nitrogenasa se ha realizado cada seis días, hasta un to-
tal de 8 medidas a lo largo del periodo de cultivo. La prime-
ra, se realizó a los 11 días de la inoculación. De cada trata-
miento se han realizado 4 repeticiones (1 repetición/1 tubo
de cultivo (5 plantas).

En los experimentos tipo B y tipo C se obtuvieron,
cuatro determinaciones de la actividad nitrogenasa, a los 15

25, 35 y 45 días de inoculación. Anteriormente, se había - constatado que eran suficientes para recojer adecuadamente el perfil de la fijación de nitrógeno. Las repeticiones estimadas en cada uno de los tratamientos ensayados han sido de 5 (1 repetición / 1 tubo de cultivo con cinco plantas). Una vez determinada la actividad nitrogenasa, se lavaron las raíces para eliminarles los residuos de etileno o acetileno que pudieran tener en su superficie y se determinó el etileno liberado por las raíces.

C) Parámetros de crecimiento

Tanto en los ensayos dedicados a estudiar la liberación de etileno por las raíces de alfalfa, como en los dedicados a observar el perfil de la nitrogenasa, se determinó, el peso seco y fresco de la raíz y parte aérea. También se llevó a cabo el contaje del número de nódulos por tubo.

5.2.- Experimentos de Cultivos Hidropónicos con Soporte Inerte (perlita-arena) en Macetas.

Para las experiencias de cultivos hidropónicos en macetas, se utilizó plantas de alfalfa (Medicago sativa, L.) inoculadas con R. meliloti. La importancia del crecimiento vegetativo de la alfalfa como planta forrajera nos llevó a mantener todos los cultivos hasta el inicio de la floración.

5.2.1.- Preparación de las Macetas.

Las macetas de polietileno, de color negro y 400 ml de capacidad, se llenaron con 450 g de una mezcla de perlita (granulometría 0 - 3 mm) y arena de cuarzo en la proporción 2:1 (v/v). Resultando la maceta con una capacidad de campo de 200 ml.

La arena de cuarzo previamente había sido lavada con ácido clorhídrico y con abundante agua para eliminar totalmente los restos de ácido. Las macetas así dispuestas se cubren por su parte superior con papel de aluminio y se esterilizan en autoclave a 115°C durante 40 minutos.

Inicialmente, a cada maceta se le adicionó estérilmente 200 ml de la solución nutritiva correspondiente, según tratamiento. Las soluciones nutritivas, previamente habían sido sometidas a un proceso de esterilización al autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se colocaron 12 semillas germinadas en condiciones estériles en cada una de las macetas y a continuación se cubren de nuevo con el papel de aluminio y se trasladan a la cámara de cultivo.

5.2.2.- Mantenimiento del Cultivo.

Una vez las plántulas habían emergido se les quitaba el episperma a las que aún lo tenían, ya que les impedía la expansión de las hojas cotiledonares. Hacia el cuarto día de cultivo, se procedió a la inoculación bacteriana. Cada maceta se inoculó con 10 ml de suspensión de células de R. meliloti, preparado según lo descrito en el apartado nº 5.1.2.

A la semana de la emergencia de las plántulas se procedió al entresacado, dejando 8 plantas de alfalfa por maceta, eliminando para ello las que más se desviaban del tamaño medio. Cada semana las macetas se permutaban de sitio en la cámara de cultivo al azar. Cada dos semanas se regaban las macetas con solución nutritiva estéril y diariamente se reponía el agua perdida, adicionando agua destilada estéril.

La duración media de cada experimento, llevado hasta el inicio de la floración, fue de 7 - 8 semanas.

5.2.3.- Diseño Experimental.

Los ensayos de cultivo hidropónico en macetas, utilizando un soporte inerte, se llevaron a cabo siguiendo los tres tipos de experimentos reseñados en el Esquema de Tratamientos. Cada uno de los experimentos tipo A, B y C consta de 6 tratamientos, de cada uno de ellos se prepararon 8 repeticiones, con objeto de tener material vegetal suficiente para todas las determinaciones fisiológicas, bioquímicas y analíticas programadas.

Las distintas repeticiones se distribuyeron al azar en la cámara de cultivo.

5.2.4.- Recogida de Muestras y Determinaciones Realizadas.

Finalizado el periodo de cultivo, se procedió a la recogida de las plantas. De cada uno de los tratamientos, cuatro repeticiones sufrían un proceso de despiece, en el cual se separaban porciones de tallos, hojas, raíces y nódulos, utilizandolas para las siguientes determinaciones que precisan de material vegetal fresco:

Actividad nitrato reductasa en hojas, raíz y nódulos.

Contenido de azúcares totales solubles y azúcares reductores en tallo, hoja y raíz.

Determinación de leghemoglobina en nódulos.

Determinación de clorofila en hoja.

Las otras cuatro repeticiones se destinaron al análisis de crecimiento y químico de las plantas. Se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento :

Número de hojas trifoliadas por planta

Longitud de los tallos

Peso fresco de las hojas

Peso fresco de los tallos

Peso fresco de las raíces

Número de nódulos por planta

Peso fresco de los nódulos

Número de tallos por maceta

Cada uno de los órganos citados se colocaron en bateas de papel convenientemente rotuladas y fueron llevados a estufa con corriente forzada de aire a 60°C durante 24 horas. Transcurridas las cuales, se sacan de la estufa, se dejan enfriar en el desecador, para estabilizar el peso seco, determinándose éste en cada uno de los órganos vegetativos citados.

Una vez se obtuvo el peso seco de todos los órganos vegetativos de las plantas, se procedió a moler la parte aérea y la raíz, separadamente, para el posterior análisis químico de la planta. El molinillo utilizado fue Moulinex, con su interior recubierto de acero inoxidable. Se consiguió un polvo fino y homogéneo que se guardó en bolsas de plástico etiquetadas.

En estas muestras se determinaron los siguientes elementos: N, P, K, S, Ca, Mg y los aniones SO_4^- y NO_3^- .

Sin embargo, antes de realizar el despiece de las plantas, se procedió a lavar la raíz con abundante agua, para eliminar los restos de arena o perlita que pudieran estar adheridos. Las plantas enteras se introdujeron en un frasco de vidrio de 650 ml de capacidad que cierra herméticamente y está preparado para poder extraer muestras de su atmósfera interna, con una jeringa especial para gases.

Tras sustituir el 10 % de la atmósfera interna por acetileno y tras un periodo adecuado de incubación se procedió a determinar la actividad nitrogenasa específica. A continuación se separó la parte aérea de la raíz, en ambas porciones se realizarán los análisis antes mencionados. La raíz fue de nuevo abundantemente lavada, ahora con agua destilada, para evitar errores en el análisis químico.

6.- METODOLOGIA UTILIZADA.

6.1.- Liberación de Etileno por las Raíces de Alfalfa.

Preparación de las muestras .- Se toman las cinco plantas de un tubo de ensayo y se separa la parte aérea de la raíz a nivel del cuello. Una vez eliminada el agua superficial de las raíces, se unen las raíces correspondientes a dos tubos de ensayo (10 plantas/repetición) y se introducen en un tubo de ensayo de 15 x 150 mm adecuado para sacar muestras de aire, del interior, con una jeringa de gases. Los tubos así preparados y rotulados según tratamientos y repeticiones, se llevan a la cámara de cultivo, convenientemente protegidos de la luz, se mantienen las 12 horas de incubación, transcurridas las cuales se extrae con una jeringa, 1 ml de la atmósfera interna y se inyecta en el cromatógrafo de gases para determinar el etileno liberado por las raíces.

Los picos de etileno que salen de cada una de las muestras son contrastados con los picos que se obtienen inyectando determinados volúmenes de un patrón, de concentración conocida. El etileno lo podemos referir a peso fresco, o peso seco de raíz o también por tubo de cultivo (5 plantas). En nuestro trabajo se expresa en nl de C_2H_4 /peso fresco/hora.

Características del cromatógrafo .- El cromatógrafo utilizado ha sido un Carlo-Erba FTV - 2350, equipado con un detector de ionización de llama y una columna de vidrio de $2\text{m} \times 4\text{ mm}$ rellena con alúmina activada de 60-80 mesh. La temperatura del horno era de 70°C . El nitrógeno fue utilizado como gas portador con un flujo de $35\text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. El flujo de hidrógeno y aire se mantuvo a 30 y $300\text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ respectivamente.

Patrón de etileno .- El patrón de etileno se prepara a partir de etileno puro, por dilución hasta la concentración adecuada. Se utiliza un frasco de vidrio de 3 l, volumen suficiente para que no se altere la concentración durante el tiempo que dura la experiencia. El tapón del frasco va horadado y provisto de un doble disco de silicona. Una capa de vaselina recubre los discos de silicona, la superficie interna del tapón y el borde externo de la boca del frasco de vidrio, además sobre los discos de silicona se deposita una fina capa de mercurio, con todo esto se asegura que no va haber pérdida de etileno en el patrón.

El frasco así preparado e invertido se sujeta a un pie de hierro y se mantiene siempre en las mismas condiciones de presión y temperatura que las muestras a medir, con lo cual, las variaciones del patrón son nulas, siempre que se mantengan rigurosamente las mismas condiciones del cromatógrafo de gases.

6.2.- Actividad Nitrogenasa Específica. Test de la Reducción del Acetileno.

Para la medida de la actividad nitrogenasa se ha seguido, salvo ligeras modificaciones para adaptar el método a nuestros requerimientos, la técnica descrita por Koch y Evans (1966) y Hardy y Knight (1968), usando cromatografía gaseosa (Burris, 1972).

Determinación de la actividad nitrogenasa

específica .- Las cinco plantas enteras de un tubo de cultivo, se ponen en un tubo de ensayo de 15 x 150 mm con tapón de rosca perforado y provisto de un disco de silicona, que permite el cierre hermético y la extracción, con jeringa de muestras de su atmósfera interna. A los tubos así preparados se les extrae el 10% de la atmósfera interna con una jeringa y se les inyecta un volúmen igual de acetileno. A tiempos determinados, 30 y 60 minutos desde que se inyecta el acetileno, se extraen muestras para inyectar en el cromatógrafo de gases y conocer el nivel de reducción, es decir la actividad nitrogenasa específica.

Los picos de acetileno y etileno fueron identificados previamente por comparación de los tiempos de retención de los correspondientes patrones. La actividad enzimática se obtiene por referencia a la curva patrón construida con los valores de los picos de los diferentes volúmenes de etileno inyectado.

El volúmen inyectado, de la muestra problema, ha sido de 0.2 ml. La actividad nitrogenasa específica, ha sido expresada en μmol de C_2H_4 / tubo de cultivo (5 plantas)/ hora.

Características del cromatógrafo .- La reducción de acetileno, fue valorada utilizando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, modelo F-33, equipado con un detector de ionización de llama, con una columna rellena de Poropak N 80 mesh, de 50 cm de longitud y 1.75 mm de diámetro interior, a la temperatura de 100°C. Como gas portador se utilizó nitrógeno a un flujo de $50 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

Preparación del acetileno .- El acetileno se obtiene directamente a partir del carburo cálcico y agua. En un frasco de vidrio de 1000 ml de capacidad y provisto de tapón de rosca perforado y con disco de silicona, para cerrar her-

méticamente, se pone la cantidad de agua y carburo cálcico - adecuada para obtener una atmósfera saturada de acetileno. Cuando el gas empieza a salir se cierra herméticamente con lo que la atmósfera interna será siempre de acetileno puro.

6.3.- Determinación de la Actividad Nitrato-Reductasa.

Se dispone actualmente de dos tipos de ensayos para la determinación de la actividad nitrato-reductasa: el ensayo "in vivo" y el ensayo "in vitro". En nuestro trabajo se ha elegido el ensayo "in vivo" utilizando la técnica de infiltración al vacío (Heuer y Plaut, 1978; Mejías, 1983).

El material vegetal en el cual se determinó la actividad nitrato-reductasa fue : las hojas apicales de la planta, la zona subapical de la raíz exenta de nódulos y los nódulos rosados y enteros.

El material vegetal se trocea homogéneamente y se coloca en tubos de ensayo de 16 x 130 mm con 5 ml de tampón - fosfato potásico 0.1 M pH 7.5 que contenía EDTA 1 mM y NO_3K 50 mM. Los tubos se pusieron en un frasco de 2 l de capacidad que se podía cerrar herméticamente y en el que se hacía el vacío. Una vez cerrado el frasco se conectó a una bomba de vacío durante 8 minutos, después de destapar el frasco y volver a tapar, se procedió a realizar de nuevo el proceso de infiltración. Con ello se consigue la eliminación de aire de los intersticios del tejido foliar, la penetración del sus-trato en dicho tejido y la posterior liberación de los nitritos formados al medio de incubación. Todas estas operaciones se realizan en cámara fría.

A continuación, los tubos se llevan a un baño a 30°C y se mantienen en oscuridad durante 3 horas, transcurridas - las cuales se sacan del baño y se agitan, para evitar gradientes de concentración que se hayan formado. Después, de cada -

tubo se toman dos alícuotas para la valoración de los nitritos formados.

Determinación de los nitritos .- Se toma una alícuota de 0.5 ml, se completa con agua destilada hasta 1 ml y se añade 1 ml de reactivo de sulfanilamida y 1 ml de reactivo de N naftil-(etilen)-diamina. La mezcla se completa con agua hasta un volumen de 5 ml, después de agitar bien, se deja desarrollar el color durante 15 minutos, a continuación se mide la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer 35 (Coleman Instruments Division).

Para la cuantificación del nitrito formado se confeccionaba una curva patrón de concentraciones conocidas de nitrito. La solución madre de nitritos se obtenía por dilución de NO_2K en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.5. La actividad nitrato-reductasa se expresa en μmol de NO_2^- formados/g peso fresco/ hora. De cada maceta se preparaban dos muestras y procedentes de cada tubo de incubación, como hemos dicho antes, se tomaban dos alícuotas, pero se hacía la media y se obtenía un solo dato por repetición en cada uno de los tratamientos realizados.

Reactivos utilizados en la valoración de nitritos.-

En la valoración de nitritos se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Ylosway, según el método de Snell y Snell, (1949). Los reactivos usados han sido : 1.- Solución de sulfanilamida, se prepara disolviendo 5 g de sulfanilamida en 100 ml de ClH concentrado y llevando a 500 ml con agua destilada : 2.- Solución de N-naftil-(etilen)-diamina diclorhidrato, se prepara disolviendo 100 g de NNEDA en 500 ml de agua destilada.

6.4.- Determinación de Azúcares en Diferentes Organos Vegetales.

Obtención de extractos vegetales de hojas y tallo.-

Se utilizó 2 g de material vegetal fresco, a los que se les adicionó 10 ml de tampón tris-ClH 1M, pH 7,5. La homogeneización de la muestra se llevó a cabo en un Sorvall Omni Mixer, a velocidad máxima en dos etapas de 1,5 minutos, cada una. Se procuró que la homogeneización fuera perfecta, para ello se abre la cámara de homogeneización al final de la primera etapa y se bajan los restos vegetales al fondo de la misma. Toda esta operación fue llevada a cabo con la cámara del homogeneizador sumergida en hielo picado para evitar el calentamiento. El homogeneizado se recogió en un tubo de centrífuga, la cámara y aspás del homogeneizador se lavaron con 2 ml de tampón que se adicionó al homogeneizado. Se filtró con una gasa de nylon y se centrifugó a 16.000 rpm, durante 10 minutos. La centrífuga utilizada era Sorvall modelo RC 58, refrigerada (Du Pont Instruments).

En el sobrenadante se procedió a precipitar las proteínas. Esta precipitación era distinta según se fuera a determinar posteriormente, azúcares totales solubles o azúcares reductores.

Obtención de extractos de raíz.-

Utilizamos el método de Bligh y Dyer (1959), modificado por Donaire (comunicación personal). Una muestra de 2 g de la zona subapical de la raíz se coloca en la cámara del Sorvall Omni Mixer y se le añaden 15 ml de metanol puro. Se homogeniza durante 1 minuto a velocidad máxima. Tanto la adición de metanol como la homogeneización se realiza en dos etapas, 7,5 ml y 30 segundos respectivamente. A continuación se adicionan 15 ml de cloroformo puro y se le proporciona de

nuevo 1 minuto de homogeneización. Finalmente se adicionan - 7,5 ml de agua salada al 0.88 % (p/v) y 1 minuto de homogeneización. Todas estas operaciones se hacen en cámara fría con la cámara de homogeneizar sumergida en un baño de hielo picado.

Las etapas del Sorvall se lavan con 2 ml de cloroformo que se recogen junto con el contenido de la cámara y se centrifuga a 5000 rpm, durante 10 minutos. Las fracciones se separan, quedando la metanólica en la parte superior y la cloroformica en la parte inferior. La fracción metanólica se vierte en un tubo de ensayo y tomando un volumen determinado p.e. de 10 ml, se reduce a la mitad en el rotavapor, con objeto de eliminar los posibles restos de cloroformo que pudieran acompañar a esta fracción. A continuación el volumen perdido en el rotavapor se restituye con agua destilada, se agita bien y se toman alícuotas para la determinación de azúcares reductores y azúcares totales.

Precipitación para azúcares totales.-

Se transfiere 1 ml de sobrenadante a un tubo de centrifuga y se agregan 5 ml de ácido tricloro-acético al 15 % enfriado a 4°C. Se deja una hora a 0° y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se toman alícuotas para determinar azúcares totales solubles.

Precipitación para azúcares reductores.-

Se transfieren 5 ml de sobrenadante inicial a un tubo de ensayo de 16 x 180 , llevándolo a continuación a un baño María en ebullición durante 10 minutos. Transcurridos los cuales se deja enfriar y se centrifuga a 10.000 rpm, 10 minutos. Del sobrenadante se toman alícuotas para determinar azúcares reductores.

Valoración por colorimetría de azúcares totales.-

Se ha utilizado el método propuesto por Trevellian y Harrison (1951), utilizando el reactivo de antrona. De cada uno de los extractos preparados como se indicó en los apartados precedentes, se toman dos alícuotas de 1 ml y se colocan en tubos de ensayo de 16 x 180mm. En el caso de que la concentración de azúcares fuera muy alta, la alícuota puede ser diluída. Esta serie de tubos, así preparada con los distintos problemas, utiliza como blanco un tubo de ensayo, que contiene 1 ml del medio en el que están disueltos todos los azúcares.

La curva patrón se prepara a partir de una serie de concentraciones de glucosa, conocidas, y un blanco con 1 ml de agua. Todos los tubos, problemas y curva, se llevan a un baño de hielo picado y se les adiciona, dejando resbalar por las paredes, 5 ml de reactivo de antrona. A continuación, se agitan vigorosamente y se llevan a baño María en ebullición durante 10 minutos exactamente, tras los cuales, se enfrían inmediatamente en agua corriente. La coloración producida se mide en un espectrofotómetro a 620 nm.

El espectrofotómetro utilizado en esta valoración y en otras descritas posteriormente ha sido un Perkin Elmer 35 (Coleman Instruments Division).

Valoración por colorimetría de azúcares reductores.-

Se ha seguido el método propuesto por Folin y Malmros (1920), utilizando como reactivo el tartrato alcalino de cobre.

Se dispone de tubos de ensayo de 16 x 180 en los cuales se coloca 1 ml de alícuota de los distintos extractos obtenidos anteriormente. De cada extracto se disponen 2 tubos con alícuota. Esta alícuota podría ser diluida convenientemente en el caso que la concentración de azúcares fuera -

muy elevada. Como blanco, esta serie de tubos problema utilizó un tubo con 1 ml de una solución en la que estaban disueltos todos los azúcares. También se preparó una serie - standar de concentraciones conocidas de glucosa y un blanco con agua destilada. Seguidamente se adicionó a cada tubo 1 ml de reactivo de tartrato alcalino de cobre.

Todos los tubos se mantuvieron durante 8 minutos en baño María en ebullición, enfriándose inmediatamente despues con agua corriente. Después se agregó 1 ml, a cada tubo, de reactivo fosfomolibdico y se dejó desarrollar el color durante 5 minutos. A continuación, se les añadió 5 ml de agua destilada, se agitó bien y se leyó la densidad óptica, a 420 nm en un espectrofotómetro.

Las concentraciones de azúcares reductores y azúcares totales se expresan como mg equivalentes de glucosa por gramo de peso fresco de material vegetal.

Preparación de los reactivos.-

1.- Reactivo de antrona .- A 20 ml de agua destilada se añaden poco a poco 100 ml de ácido sulfúrico concentrado. En el momento de usar se disuelven 0.2 g de antrona en 100 ml de esta mezcla.

2.- Tartrato alcalino de cobre .- Este reactivo - consta de dos soluciones que deben ser preparadas por separado, aunque su utilización es conjunta. La solución A se prepara disolviendo 5 g de sulfato cúprico cristalizado en 100 ml de agua destilada. Conservándose en un frasco oscuro. La solución B se elabora a partir de 35 g de carbonato sódico anhidro, 13 g de tartrato sódico y 11 g de bicarbonato - sódico que se disuelven en 1 l de agua destilada. Antes de usar se deben mezclar bien 1 volumen de solución A con 9 de solución B.

3.- Reactivo fosfo-molibdico .- Disolver 300 g de molibdato sódico en 1 litro de agua destilada. Pasarlo a un Erlenmeyer y agregar 0.25 ml de agua de bromo, una vez agitados vigorosamente, se dejan en reposo hasta que la solución quede bien clara. Entonces se transfieren 500 ml de esta solución a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, de boca ancha, agregando poco a poco y agitando 225 ml de ácido fosfórico, del 85 % y 150 ml de ácido sulfúrico 1/4 (v/v). Seguidamente se hace borbotear aire durante 1 hora a través de la mezcla para eliminar el exceso de bromo. Finalmente se pasa el contenido a un matraz aforado de 1 litro y se agregan 75 ml de ácido acético glacial, enrasándose a continuación con agua destilada. Conservar en frasco oscuro.

6.5.- Determinación de Clorofila.

De la extensa metodología existente para la determinación de clorofila y tras comprobar distintos métodos, en nuestro trabajo se ha empleado la propuesta por Bruinsma , (1961), convenientemente adaptada a nuestras necesidades.

Muestras de 2 g de hoja troceada se ponen en la cámara de homogeneización de un Sorwall Omni-Mixer. Se le añade una pizca de CO_3Ca para evitar la posible acidificación, del extracto, por los jugos vacuolares, y 20 ml de acetona pura. A continuación se homogeneiza durante 2 minutos a velocidad máxima y se filtra a través de un embudo con placa porosa de poro adecuado. El residuo se recoge de nuevo y se somete a otra homogeneización con 15 ml de acetona, durante 1 minuto, volviéndose a filtrar y recogiendo el filtrado junto con el anterior. El residuo queda totalmente blanquecino. Todas estas operaciones se realizan en cámara fría y protegiendo a la clorofila de la luz. Inmediatamente se mide el volumen de solución acetónica de clorofila y se pone en un tubo de ensayo con tapón de rosca y cierre hermético, para

evitar la evaporación de acetona y que la solución se concentre.

Se toman alícuotas de 1 ml de la solución de clorofila, dejándola evaporar hasta sequedad en corriente de aire. El residuo seco se disuelve con 5 ml de acetona-agua, (4/1), midiendo a continuación la absorción a 645, 652, 663 y 750 nm en el espectrofotómetro. Si la lectura a 750 fuera superior a 0,01 indica que la solución tiene alguna turbidez, debiéndose corregir los datos obtenidos aplicando el factor de corrección de turbidez.

λ	FACTOR	
645 nm	1	
652 nm	1	$D_{\lambda} = D_{\lambda} - f(D_{750} - 0,002)$
663 nm	1	

La valoración cuantitativa de la clorofila se realiza a partir de los datos de absorción aplicando las siguientes ecuaciones :

$$20,2 \times D_{645} + 8,02 \times D_{663} = X$$

$$\frac{D_{652} \times 1000}{34,50} = Y$$

$$\frac{X + Y}{2} = Z$$

Z x 5 son los μg de clorofila en la alícuota. Finalmente los datos son expresados en mg de clorofila por g peso fresco de hoja.

6.6.- Determinación de Leg-Hemoglobina en Nódulos.

La preparación de extractos con las proteínas del nódulo se hizo de acuerdo con Bisseling et al. (1978).

Los nódulos se colocaron en tampón Tris-ClH, 25 mM pH 7.0, en una proporción de 0.2 g de nódulos por ml tampón

siendo homogeneizados en un "potter" manual. El homogenado se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos. Se considera que el sobrenadante contiene las proteínas solubles del nódulo.

Para determinar la concentración de hemo presente en cada extracto, se empleó el método del hemocromo (De Duve, 1948). A una muestra de cada extracto se le adiciona un volumen igual de piridina 4,2 M en NaOH 0.2 M. La mezcla se dividió en dos muestras iguales, una fue oxidada adicionando una pizca de ferricianuro potásico y la otra fue reducida con una pizca de ditionito sódico. Seguidamente se registró la diferencia de absorbancia a 556 nm ($\Delta A_{556 \text{ nm}}$) y a 539 nm ($\Delta A_{539 \text{ nm}}$). La concentración de hemo se calculó empleando su coeficiente de extinción milimolar: ξ (mM)

$$\xi \text{ (mM)} = \Delta A_{556 \text{ nm}} - \Delta A_{539 \text{ nm}} = 23,4$$

Es decir para 1 mMol de hemo en cubeta, la diferencia anterior es 23,4.

Esto nos da una buena indicación de la concentración de leg-hemoglobina puesto que, según demostró Appleby, (1974) el 70 % del hemo en un extracto crudo de nódulo procede de la leg-hemoglobina.

6.7.- Determinaciones Analíticas.

Los métodos empleados son los que se utilizan en la Estación Experimental del Zaidín, descritos por La Chica et al. (1965, 1973). Los resultados se expresan en % de materia seca a 70°C, excepto el contenido de N-NO_3^- que se expresa en ppm.

6.7.1.- Mineralización de la Muestra.

Para la determinación de los macronutrientes N, P, K, Ca y Mg se utilizó la mineralización por vía húmeda propuesta por Peach y Tracey (1956) y descrita por La Chica et al. (1965).

Se pesan 0,25 g de la muestra molida, perfectamente seca y se disponen en un matraz Kjendahl. Se agregan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Una vez calentado 15 minutos y enfriado se le agrega 1,5 ml de agua oxigenada al 30% exenta de fósforo. Se vuelve a calentar otros 15 minutos y se le adiciona agua oxigenada de nuevo que se eliminará por calentamiento. El mineralizado que será arrastrado con agua destilada, se transvasa a un matraz aforado de 50 ml. De este mineralizado se tomarán alícuotas para determinar los nutrientes anteriormente indicados.

6.7.2.- Determinación de Nitrógeno.

Se utiliza el aparato de Bouat (Bouat y Croucet, 1965) que permite efectuar simultáneamente la destilación y la valoración del amoniaco formado al reaccionar el mineralizado con NaOH. El arrastre del vapor de amoniaco se efectúa por corriente de aire que sirve, además para vaciar el contenido del matraz colector, una vez finalizada la valoración de cada muestra, lo cual confiere una notable velocidad al análisis de grandes series de muestras.

Procedimiento :

Se introduce una alícuota del mineralizado (2-10 ml) en el matraz Kjendahl del aparato, junto con 25 - 30 ml de agua. Seguidamente se agregan 3 g de NaOH en lentejas y se acopla inmediatamente el matraz al aparato, fijándolo con una pinza metálica.

Una vez disuelto el hidróxido sódico, lo cual se favorece por agitación del matraz, se calienta éste con el mechero y comienza la destilación del amoniaco que irá fluyendo, ayudado por el vacío producido por la trompa incorporada al aparato, al matraz colector y va siendo neutralizado con el ácido sulfúrico 0,005 N que lleva el indicador incorporado. Cuando no llega más amoniaco al matraz colector se agregan unos tres ml de alcohol al 50 % por la parte alta del tubo refrigerante: el arrastre del alcohol lleva consigo el lavado de las últimas fracciones del amoniaco condensado que pueda quedar en el circuito de destilación y requiere, naturalmente, una última neutralización.

Se utiliza el indicador Shiro-Tashiro, que se prepara disolviendo 0,125 g de rojo de metilo y 0,08g de azul de metileno en 100 ml de alcohol etílico. En 500 ml de ácido sulfúrico 0,005 N se adicionan 40 gotas del indicador.

6.7.3.- Determinación de Fósforo.

Se basa en la medida colorimétrica del azul de molibdeno obtenido a partir del complejo fosfomolibdico, utilizando amidol y sulfito sódico como reductor, siguiendo la técnica descrita por Capitán y Martínez (1954). Al matraz de reacción se adiciona el Reactivo de Morgan que contribuye a la estabilidad del color (LaChica et al., 1965).

Procedimiento :

En un matraz aforado de 50 ml se adiciona 25 ml de agua destilada, 2 ml de mineralizado, 5 ml de reactivo Morgan, 5 ml de molibdato amónico y otros 5 ml de solución de amidol, se enrasa con agua destilada y se agita. Después de hora y media se procede a la lectura fotométrica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 830 nm.

Simultáneamente y de forma idéntica, se prepara una curva patrón con concentraciones conocidas de fosforo. Con sus lecturas se construye la curva patrón en la que se interpolan las lecturas de las muestras problemas.

Preparación de reactivos

1.- Reactivo de Morgan : Se disuelven 200 g de acetato sódico cristalizado en un litro de agua, se agregan 65 ml de ácido acético glacial y se lleva a un volumen total de dos litros con agua destilada (pH 4,75 - 4,85).

2.- Solución de molibdato amónico : Se disuelven 25 g de molibdato amónico en 500 ml de agua destilada. Después se adicionan 500 ml de SO_4H_2 10N.

3.- Solución de sulfito sódico : Se disuelven 125g de sulfito sódico anhidro en un litro de agua destilada.

4.- Solución de amidol (Clorhidrato de 2-4 diamino fenol) : En 100 ml de una mezcla de, 30 ml de la solución de sulfito sódico y 70 ml de agua, se disuelve 1,5 g de amidol. A continuación se agregan 770 ml de la solución de sulfito sódico y 10 g de ácido tartárico (como conservador de la solución). Enrasar a 1 l con agua destilada.

6.7.4.- Determinación de Potasio.

Se empleó la técnica de fotometría de llama, partiendo de 10 ml de mineralizado que se pasan a un matrazaforado de 25 ml completando con agua. Después de homogeneizar se realiza la lectura en el fotómetro de llama midiendo a 775 nm o bien utilizando el filtro correspondiente al potasio.

La lectura de cada muestra se interpola en la curva patrón construida con las lecturas correspondientes a unos patrones de concentración de potasio conocida.

6.7.5.- Determinación de Calcio y Magnesio

Se ha empleado espectrofotometría de absorción atómica, utilizando la línea 4224 \AA (Ca) y 2852 \AA (Mg), con llama oxidante aire-acetileno.

El calcio puede formar compuestos difícilmente atomizables en la llama, pudiendo estar sujeta su determinación a errores por la formación de compuestos refractarios. La adición de lantano, usando una llama de aire acetileno, subsana este inconveniente y permite una medida exacta del calcio (De Waele, 1970).

La determinación de magnesio por espectrofotometría de absorción atómica, no presenta los problemas de interferencias que existen en el caso del calcio y puede determinarse directamente en el mineralizado.

Procedimiento :

La determinación del magnesio se realiza directamente sobre la solución, formada por 5 ml de mineralizado diluidos en 100 ml de H_2O . Para la determinación de calcio es preciso mezclar la muestra con la solución de lantano al 3% en la proporción de 10/1.

Esta solución se prepara atacando 35,1 g de La_2O_3 con 60 ml de ClH concentrado y calentando suavemente hasta disolución completa. Una vez fría la solución se lleva a 1 l con H_2O .

Las lecturas obtenidas se interpolan en la curva patrón construida al efecto a partir de patrones de concentración de calcio y magnesio conocida.

6.7.6.- Determinación de Azufre Total.

Se utiliza la mineralización por vía húmeda propuesta por Bethge (1954) y descrita por LaChica et al. (1965).

La mineralización consiste en un ataque a la muestra vegetal con una mezcla formada por solución de vanadato amónico, solución de dicromato potásico y mezcla oxidante nítrico perclórica. El ataque, a reflujo, de la muestra se realiza dos veces.

Para la valoración del azufre total, se usa el método fotométrico de LaChica (1964) en él, se realiza la precipitación del azufre, al estado de sulfato bórico, utilizando un agente tensioactivo, Tween 80, para mantener en suspensión dicho precipitado, con vistas a su posterior determinación turbidimétrica. La lectura espectro-fotométrica se realiza a 430 nm.

Se preparan unos patrones con concentraciones conocidas de azufre a partir de cuyas lecturas se confecciona una curva en la que se interpolan las lecturas de las muestras.

Preparación de reactivos

1.- Mezcla oxidante : Se mezcla 80 ml de ácido perclórico con 200 ml de ácido nítrico.

2.- Solución de vanadato amónico : Se disuelve 0.344 g de vanadato amónico en 100ml de ácido perclórico.

3.- Solución de dicromato potásico : Se disuelven 300 g de dicromato potásico en 100 ml de agua destilada.

4.- Solución de cloruro bórico - Tween 80 : Disolver 200 ml de Tween 80 en 800 ml de solución de cloruro bórico, que se obtiene disolviendo 100 g de cloruro bórico en 1 l de agua, agitandola enérgicamente.

6.7.7.- Determinación de Azufre en forma de Sulfatos.

La extracción de sulfatos del material vegetal molido se realiza con ácido acético y carbón activo decolorado. La decoloración del carbón activo se realiza con ácido perclórico y posteriores lavados, hasta que el filtrado da reacción neutra. El filtrado procedente de la extracción debe ser claro y transparente.

La valoración se lleva a cabo por turbidimetría utilizando una solución de cloruro bórico-Tween 80. El Tween 80 actúa como agente tensoactivo. A 10 ml del filtrado se adicionan 20 ml de una solución ClH - sulfato y 10 ml de cloruro bórico-Tween 80, se enrasa con ácido acético 0,5 N el matraz aforado de 50 ml. La lectura fotométrica se realiza frente un blanco en el que se ha eliminado la adición de los 20 ml de la solución ClH - sulfato, utilizando filtro rojo. Debe hacerse transcurridos al menos 30 minutos.

De igual forma se preparan una serie de patrones con concentraciones conocidas de azufre y que se utiliza como curva patrón.

6.7.8.- Determinación de Nitratos.

Se ha seguido el método descrito por Rouchenco (1967) para la determinación de nitratos en jugos vegetales, adaptado por Aguilar et al. (1980), a la determinación del N-NO_3^- en material vegetal pulverizado y seco. Este se basa, en la extracción acuosa del material vegetal seguido por la reducción de nitratos a nitritos en una columna reductora de zinc-cadmio y posterior determinación de éstos mediante el reactivo de Griess.

Procedimiento :

Después de pesar 0,5000 g de material vegetal molido e introducirlo en un frasco de 250 ml de capacidad, se agregan 100 ml de agua destilada y se dispone en un agitador vuelta-vuelta durante 15 minutos. A continuación se filtra sobre un matraz aforado de 50 ml en el que se han puesto previamente 10 ml de solución tampón de pH 9,6 y se enrasa con el filtrado. Después de homogeneizar se pasa una alícuota del filtrado por la columna reductora, recogiendo la solución en un matraz de 100 ml en el que previamente se habrán puesto 50 ml de la solución tampón de pH 4,8, continuando el lavado de la columna con pequeñas porciones de agua hasta enrasar el matraz. Homogeneizar el contenido.

Para la valoración de los nitritos se adicionan a 5 ml del filtrado anterior 5 ml de reactivo de Griess, en un tubo de ensayo provisto de tapón de rosca, agitando a continuación. Luego se llevan los tubos a un baño a 30°C durante 15 minutos, transcurridos los cuales, se sacan del baño y se dejan en reposo. Se ha de medir la D.O. del color formado, en un espectrofotómetro a 475 nm, dentro del intervalo de tiempo comprendido entre los 20 y 60 minutos de haberlo sacado del baño. El valor de la densidad óptica obtenida, se interpola en la curva patrón, confeccionada con concentraciones conocidas de $N-(NO_2^-)$.

El reactivo de Griess consta de dos soluciones una lleva ácido sulfanílico que se disuelve en ácido acético, calentando suavemente. La otra solución lleva alfa-naftilamina y ácido acético. El reactivo se prepara en el momento de usarlo, mezclando volúmenes iguales de ambas soluciones.

7.- ELABORACION DE LOS DATOS Y ESTUDIO ESTADISTICO
REALIZADO

Los datos originales, para cada parámetro estimado se han recogido en tablas donde se ordenan por tratamientos y repeticiones. En cada tabla se especifica el parámetro de que se trata, unidades en que se expresa y el tipo de Experimento, siguiendo las mismas pautas detalladas en anteriores apartados de Material y Métodos; así como tratamientos y repeticiones de que consta. Para aquellos parámetros que se han medido a lo largo del tiempo, también se indica la determinación a que corresponde. Una gran parte de estas tablas, en las cuales se incluye el análisis estadístico realizado, se ha creído oportuno agruparlas en un "addendum" final. De forma que en el apartado de resultados y discusión, se exponen fundamentalmente tablas resumen que incluyen los valores medios de varios parámetros muy relacionados o de un sólo parámetro determinado a lo largo del tiempo, con lo cual se facilita el estudio y la discusión de los resultados obtenidos y también se aprecian mejor las tendencias de dichos parámetros, ya sea en función del tiempo, de los tratamientos o de ambos. En estas tablas, confeccionadas con los valores medios de cada tratamiento y cada parámetro, se incluye además el % de cada tratamiento respecto al testigo y un extracto del análisis estadístico realizado. Para una mejor clarificación y comparación, otros parámetros se han recogido en forma de gráficos resumen, elaborados con los valores medios de cada tratamiento.

El análisis estadístico al que hemos sometido los datos ha sido el análisis de la varianza utilizando un ordenador Comodore modelo 3032, equipado con una unidad de disco e impresora.

De acuerdo con el diseño experimental empleado y que ya ha sido expuesto antes, el análisis estadístico realizado ha sido un análisis de la varianza, de una sola en -

trada, en el que se ha sacado solo la varianza debida a los tratamientos incluyendo toda la de más, debida a otras causas, en el error.

También se ha obtenido la tabla de mínimas diferencias significativas para los niveles de significación de 0,05; 0,01 y 0,001.

A los datos referentes a la liberación de etileno por las raíces de alfalfa a lo largo del tiempo así como los referentes a nodulación, en estas mismas plantas, cultivo hidropónico en tubos, experimentos A, se les hizo el análisis de la varianza solo en función de las determinaciones realizadas. Además hemos creído oportuno hacer un análisis de diferencias entre medias por la t de Student en función del tiempo de cultivo para facilitar la comparación entre algunos puntos. Dado que las determinaciones no coinciden en el tiempo, como ya ha sido explicado antes en este capítulo de la presente memoria.

Igual se ha hecho al estudiar la evolución de la nodulación en estos mismos experimentos. En estas tablas se hace una comparación entre tratamientos en diferentes momentos del cultivo. Se exponen en forma de triángulo, e incluyen el valor de la t y el nivel de significación.

Este análisis también ha sido aplicado a los datos de etileno liberado por la raíz, correspondientes a los experimentos B y C en tubos de ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Antes de exponer los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados, mediante tablas y gráficas, es oportuno indicar que, al objeto de facilitar la realización de las condiciones experimentales e identificar los tratamientos aplicados, los resultados de los experimentos van a ser presentados junto con la discusión de los mismos, siguiendo la secuencia utilizada en el capítulo de Material y Métodos.

1.- EXPERIMENTOS DE CULTIVOS HIDROPONICOS EN TUBOS DE ENSAYO.

1.1.- Experimentos Tipo 1 (Diferentes relaciones N/S)

En este primer experimento, previo, se tuvo de presente el efecto que el sistema endógeno, liberado por las raíces de leguminosas, produce en el cultivo de arroz. Se utilizaron cultivos acuáticos en tubos de ensayo y se midió líquido a través de los cuales se recogió el exudado radicular, durante toda la etapa crítica de la formación del nódulo, desde la inoculación hasta el momento de la aparición de nódulos.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestra la relación que sigue el desarrollo de nódulos por las raíces de alfalfa en el cultivo del arroz durante el tiempo, a lo largo de 22 días de vida del período de cultivo. Durante este período de tiempo, se hicieron 2 experimentos, el primero a partir del día 10 de la inoculación y el segundo a partir del día 15 de la inoculación. Los resultados de ambos experimentos se muestran en la tabla 1. Se puede observar que el desarrollo de nódulos en el cultivo del arroz es muy lento y que se produce a partir del día 10 de la inoculación. Durante el período de cultivo, se observó que el desarrollo de nódulos en el cultivo del arroz es muy lento y que se produce a partir del día 10 de la inoculación. Durante el período de cultivo, se observó que el desarrollo de nódulos en el cultivo del arroz es muy lento y que se produce a partir del día 10 de la inoculación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Antes de exponer los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados, mediante tablas y gráficas, es oportuno indicar que, al objeto de facilitar la localización de las condiciones experimentales e identificar los tratamientos empleados, los resultados de los experimentos van a ser presentados junto con la discusión de los mismos, siguiendo el modelo utilizado en el capítulo de Material y Métodos.

1.- EXPERIMENTOS DE CULTIVOS HIDROPONICOS EN TUBOS DE ENSAYO.

1.1.- Experimentos Tipo A (Diferentes relaciones N/S)

En este primer experimento, previo, se puso de manifiesto el efecto que el etileno endógeno, liberado por las raíces de leguminosas, ejerce en la nodulación. Se emplearon cultivos axénicos en tubos de ensayo y en medio líquido a través de los cuales se pudo seguir un control detallado, de toda la etapa crítica en la formación del nódulo, desde la inoculación hasta que se estabiliza el número de nódulos.

En la tabla 6 se muestra la evolución que sigue el desprendimiento de etileno por las raíces de alfalfa en función del peso fresco y del tiempo, a lo largo de 32 días que duró el periodo de cultivo. Durante este periodo de tiempo, se hicieron 9 determinaciones de etileno, a partir del día de la inoculación y siguiendo la pauta descrita en Material y Métodos. Esta tabla es resumen de una serie de ellas (I a la IX) comprendidas en el "addendum" de esta Memoria, en cada una de ellas va incluido el análisis estadístico correspondiente. Para una mejor comparación entre los diferentes tratamientos, se ha representado gráficamente esta tabla en la Figura 8. También se ha considerado oportuno realizar un

análisis diferencial entre los datos obtenidos, de los diferentes tratamientos realizados, mediante la "T" de Student, a lo largo del tiempo de cultivo (Tabla 7).

Otros parámetros determinados en cada una de las medidas de etileno han sido : a) El peso seco de las raíces de alfalfa, de cada uno de los tratamientos realizados en distintos momentos a lo largo del tiempo del cultivo, que se expone en las tablas X a la XVIII ambas inclusive del "adendum" y en forma resumida en la tabla 8. b) El número de nódulos determinados en cada tratamiento durante el periodo de cultivo se exponen en la tabla 9 y de forma gráfica en la figura 10. Los datos anteriores fueron sometidos al análisis estadístico conveniente ("T" de Student) que se recoge en la tabla 10.

Se observa que las distintas relaciones N/S en el medio de cultivo van a influir en la liberación de etileno por las raíces, siendo los tratamientos con más dosis de nitrógeno los que liberan más etileno, como se pone de manifiesto desde la primera medida antes de la inoculación (Figura 8).

En todos los tratamientos hay una respuesta inmediata a la inoculación, que se podría interpretar como una reacción defensiva de la planta frente a la bacteria. Es conocido que las plantas liberan etileno como respuesta al envejecimiento natural (Frenkel et al., 1968) o artificial (Abeles, 1973), al tratamiento con productos químicos nocivos (Abeles y Abeles, 1972) o a la infección por microorganismos (Pegg, 1976). A este respecto se podría pensar que la liberación de esta hormona, por las raíces de alfalfa inoculadas con R. meliloti, estaría inducida por un stress. Respuestas similares han sido descritas en otras plantas y con otros microorganismos por Toppan et al. (1982). Esta respuesta es mucho más intensa en los tratamientos con elevadas dosis de nitrógeno en el medio de cultivo como el 1 y 2 con una relación N/S, por tanto, de 5,0 y 1,60 respectivamente.

Tabla 6.- Etileno liberado por las raíces de alfalfa inoculadas, en $\text{nlC}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, en cada una de las determinaciones realizadas durante el período de cultivo. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DETERMINACIONES REALIZADAS								
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º
1	\bar{X}	7,67	9,52	12,59	8,78	4,75	3,55	4,52	5,36	5,74
	% testigo	120	117	187	110	71	64	87	216	278
2	\bar{X}	9,32	12,41	12,88	8,00	4,86	5,11	4,47	2,51	3,41
	% testigo	146	152	191	101	72	92	86	101	165
3	\bar{X}	5,42	6,36	5,70	4,10	3,68	3,68	3,99	2,28	3,05
	% testigo	85	77	85	51	55	67	77	92	148
4	\bar{X}	4,53	5,15	6,38	5,17	5,15	4,65	3,96	2,35	1,58
	% testigo	71	63	77	65	77	84	76	95	76
5	\bar{X}	5,01	6,05	5,68	4,86	4,84	4,06	3,31	2,22	1,95
	% testigo	78	74	84	61	72	73	64	90	95
6	\bar{X}	6,39	8,17	8,28	7,96	6,72	5,53	5,18	2,48	2,06
	testigo	100	100	100	100	100	100	100	100	100
N.P.		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	0,872	0,980	0,983	0,846	0,614	0,672	0,747	0,365	0,572
MDS	0,01	1,185	1,333	1,336	1,150	0,835	0,913	1,015	0,497	0,777
	0,001	1,587	1,785	1,790	1,540	1,119	1,223	1,360	0,665	1,041

TABLA 7.- Análisis de diferencias entre medias, procedentes de la tabla anterior, por la T de Student en función del tiempo de cultivo.

DIA 14 DE CULTIVO							DIA 16-17 DE CULTIVO						
TRATAMIENTOS							TRATAMIENTOS						
t	1	2	3	4	5	6	t	1	2	3	4	5	6
1	-	-0,5005	20,9722	17,082	17,3108	9,7962	-	1,6335	14,3064	8,0165	10,7520	1,1340	
		-	***	***	***	***		-	***	***	***	-	
2			19,7906	16,3254	16,6384	9,7179			11,9769	6,7082	8,5291	-0,6301	
			***	***	***	***			***	***	***	-	
3				-4,7279	-3,0893	-13,2788					-5,2116	-6,0834	-14,8079
				**	*	***					***	***	***
4					1,0526	-8,3848						1,0525	-8,1665
					-	***						-	***
5						-8,9482							-10,6824
						***							***

DIA 20 DE CULTIVO							DIA 22-23 DE CULTIVO						
t	1	2	3	4	5	6	t	1	2	3	4	5	6
1	-	-0,3716	2,4029	2,4001	4,8312	-0,9492	-	-6,7082	11,0876	9,4868	13,5601	6,7914	
		-	*	*	**	-		***	***	***	***	***	
2			3,9537	3,7790	8,0342	-0,8108				12,5070	11,6848	1,2324	10,4865
			**	**	***	-				***	***	***	***
3				0,1141	3,0521	-2,9016					0,6111	0,7308	-1,3502
				-	*	*					-	-	-
4					2,7004	-2,9039						1,3254	-0,8252
					*	*						-	-
5						-4,7195							-1,9147
						**							-

*, **, ***, indican el nivel de probabilidad P= 0,05, 0,01 y 0,001 respectivamente.

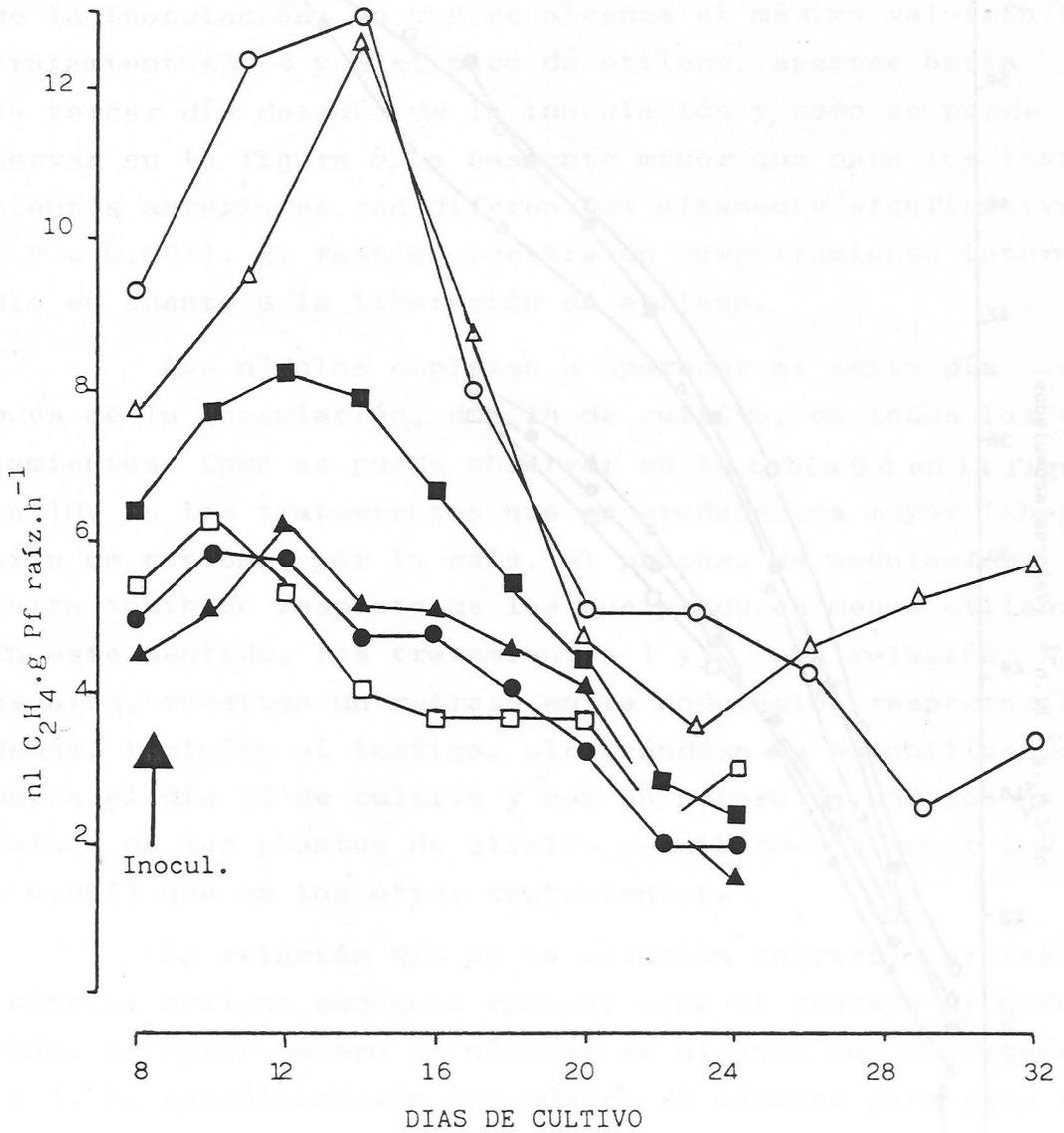


Fig. 8.-Etileno liberado por las raíces de alfalfa inoculadas con *R. meliloti* en experimentos tipo A, a lo largo del período de cultivo. Tratamiento: 1(Δ); 2(○); 3(□); 4(▲); 5(●) y T(■).

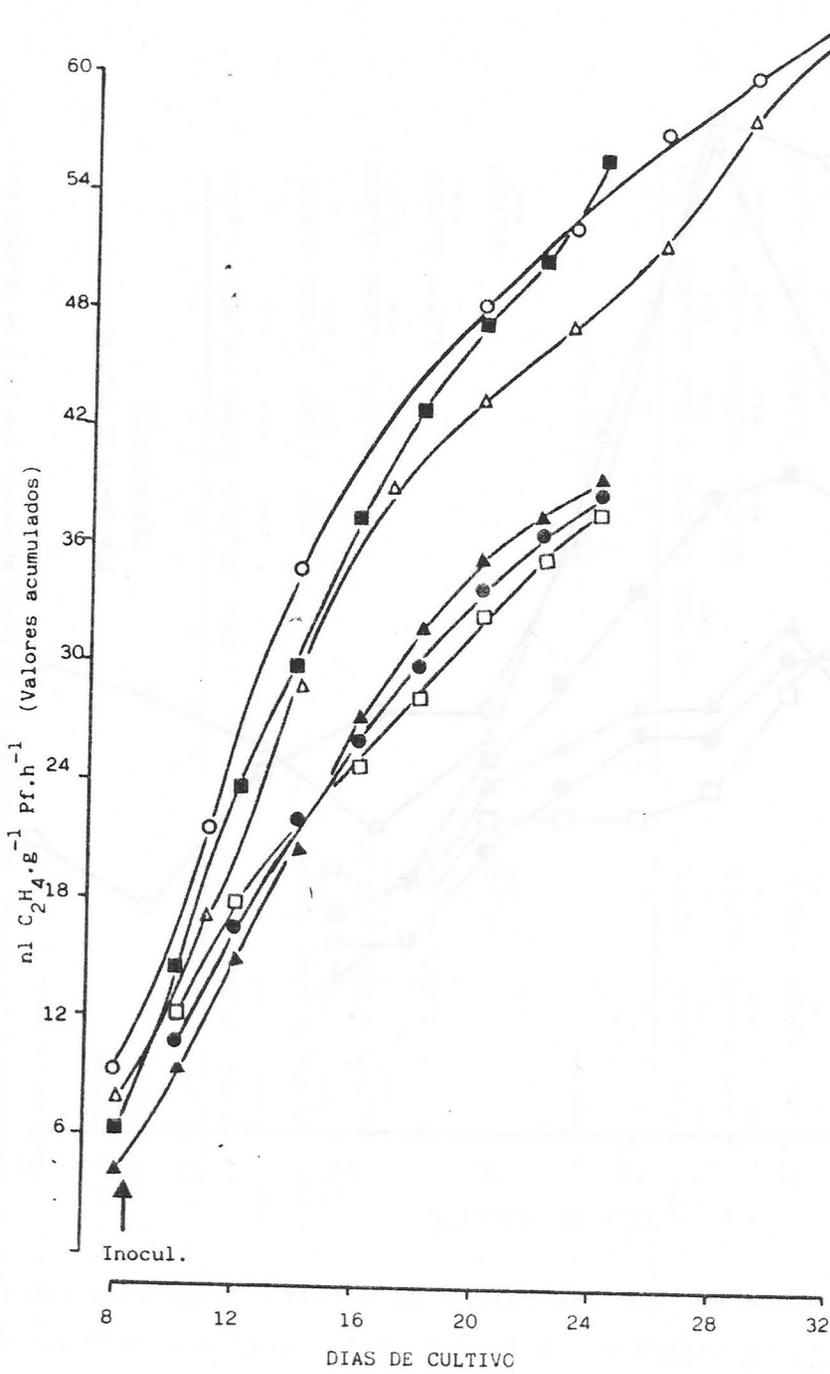


Fig. 9.- Niveles de etileno acumulado por las raíces de alfalfa a lo largo del período de cultivo. Tratamiento 1 (Δ); 2(O); 3(□); 4(▲); 5(●) y T(■).

En estos tratamientos el etileno liberado por la raíz inoculada sigue incrementando hasta el día 6, después de la inoculación, en que se alcanza el máximo valor. En los tratamientos 3, 4 y 5 el pico de etileno, aparece hacia el tercer día después de la inoculación y, como se puede observar en la figura 8, es bastante menor que para los tratamientos anteriores con diferencias altamente significativas ($P = 0,001$). El testigo muestra un comportamiento intermedio en cuanto a la liberación de etileno.

Los nódulos empiezan a aparecer al sexto día después de la inoculación, día 14 de cultivo, en todos los tratamientos. Como se puede observar en la tabla 9 ó en la figura 10, en los tratamientos que se produce una mayor liberación de etileno, por la raíz, el proceso de nodulación resulta inhibido respecto de los que producen menos etileno. En este sentido, los tratamientos 1 y 2 cuya relación N/S, es alta, muestran un retraso en la nodulación respecto a los demás, incluido el testigo, alcanzándose la estabilización hacia el día 30 de cultivo y con un número de nódulos en las raíces de las plantas de alfalfa sensiblemente menor ($P = 0,001$) que en los otros tratamientos.

La relación N/S en la solución nutritiva afecta tanto al etileno endógeno radical como al proceso de nodulación. El mayor número de nódulos se alcanza con el tratamiento 5. La estabilización del número de nódulos para este tratamiento y para aquellos cuya relación N/S es bastante similar a la de éste (tratamiento 3 y 4) se logra hacia el día 23 de cultivo. El testigo muestra una nodulación más pobre, que los tratamientos anteriores, pudiendo deberse a la mayor cantidad de etileno liberado por las raíces de estas plantas.

Al estudiar la evolución de etileno y el desarrollo del nódulo se observa un pico o pulso asociado con el inicio de la nodulación, evento morfogénico clave del proceso. Esto sugiere la idea que el etileno podría estar im -

TABLA 8.- Peso seco, expresado en mg, de las raíces de alfalfa inoculadas, en el muestreo realizado, de los diferentes tratamientos. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DETERMINACIONES REALIZADAS								
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º
1	\bar{X}	2,16	2,70	3,32	5,12	5,14	7,02	7,58	10,10	10,38
	% testigo	81	93	94	117	102	109	120	150	138
2	\bar{X}	2,20	3,04	3,36	4,66	6,06	7,76	8,48	10,46	10,54
	% testigo	82	105	95	107	120	121	135	156	140
3	\bar{X}	3,17	2,87	3,31	3,74	4,49	4,56	4,93	5,56	6,44
	% testigo	119	99	93	86	89	71	78	83	85
4	\bar{X}	2,53	2,94	2,98	3,65	4,30	4,48	4,90	5,64	6,58
	% testigo	95	101	84	84	85	70	78	84	87
5	\bar{X}	2,86	2,98	3,22	4,17	4,45	4,98	5,12	6,30	6,52
	% testigo	107	103	91	96	80	78	81	94	86
6	\bar{X}	2,67	2,90	3,55	4,36	5,04	6,40	6,30	6,72	7,54
	testigo	100	100	100	100	100	100	100	100	100
N.P.		0,001	-	0,1	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	0,353	-	0,341	0,606	0,538	0,913	0,961	1,282	1,013
MDS	0,01	0,494	-	0,464	0,823	0,731	1,241	1,307	1,742	1,377
	0,001	0,661	-	0,621	1,103	0,980	1,662	1,750	2,334	1,844

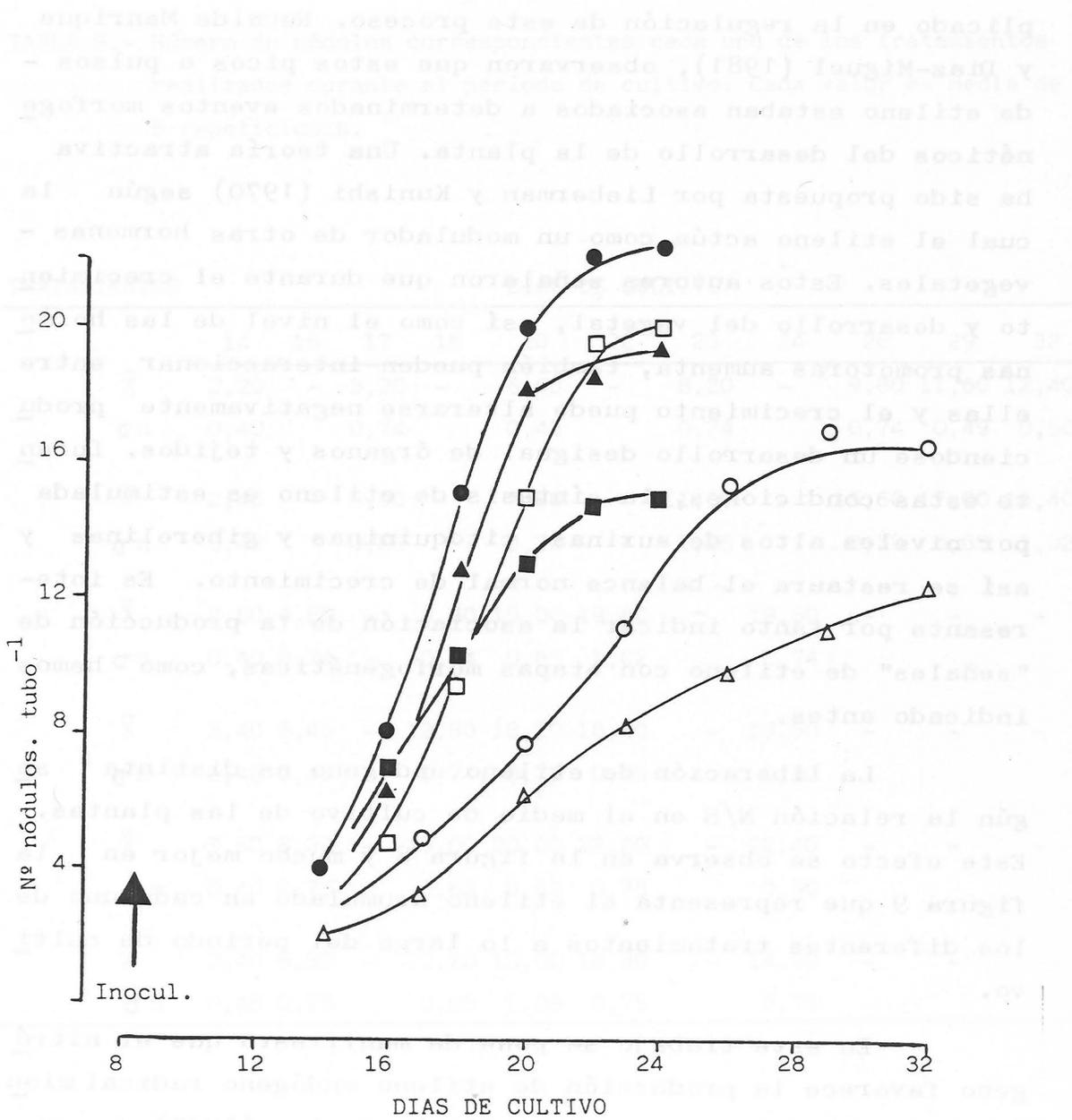


Fig. 10.- Número de nódulos determinados en cada medida de etileno - realizada, a lo largo del período de cultivo. Tratamiento 1(Δ); 2(O); 3(□); 4(▲); 5(●) y T (■).

plicado en la regulación de este proceso. Recalde Manrique y Diaz-Miguel (1981), observaron que estos picos o pulsos - de etileno estaban asociados a determinados eventos morfogenéticos del desarrollo de la planta. Una teoría atractiva ha sido propuesta por Lieberman y Kunishi (1970) según la cual el etileno actúa como un modulador de otras hormonas vegetales. Estos autores señalaron que durante el crecimiento y desarrollo del vegetal, así como el nivel de las hormonas promotoras aumenta, también pueden interaccionar entre ellas y el crecimiento puede alterarse negativamente produciéndose un desarrollo desigual de órganos y tejidos. Durante estas condiciones, la síntesis de etileno es estimulada por niveles altos de auxinas, citoquininas y giberelinas y así se restaura el balance normal de crecimiento. Es interesante por tanto indicar la asociación de la producción de "señales" de etileno con etapas morfogenéticas, como hemos indicado antes.

La liberación de etileno endógeno es distinta según la relación N/S en el medio de cultivo de las plantas. Este efecto se observa en la figura 8 y mucho mejor en la figura 9 que representa el etileno acumulado en cada uno de los diferentes tratamientos a lo largo del periodo de cultivo.

En este trabajo se pone de manifiesto que el nitrógeno favorece la producción de etileno endógeno radicalmente mientras que el sulfato lo inhibe. Lluch et al. (1982) describen que los niveles altos de azufre inhiben la liberación de etileno y favorecen la nodulación. Se podría pensar que el efecto que ejerce la nutrición azufrada y nitrogenada sobre el proceso de nodulación, estaría mediado por la producción de etileno endógeno radical.

En los tratamientos que más etileno endógeno liberan las raíces, se inhibe la nodulación respecto al testigo. Estos resultados son similares a los que obtienen Grobbelaar et al. (1971), cuando suministran exogenamente etileno a -

TABLA 9.- Número de nódulos correspondientes cada uno de los tratamientos realizados durante el período de cultivo. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DIAS DE CULTIVO										
		14	16	17	18	20	22	23	24	26	29	32
1	\bar{X}	2,20	-	3,20	-	6,60	-	8,20	-	9,80	11,60	12,40
	σ_n	0,40		0,74		0,45		0,74		0,74	0,49	0,50
2	\bar{X}	2,40	-	5,00	-	7,80	-	11,00	-	15,60	17,00	16,40
	σ_n	0,48		0,89		0,74		1,26		0,80	0,63	1,02
3	\bar{X}	2,80	4,80	-	9,80	15,00	19,60	-	19,80	-	-	-
	σ_n	0,40	0,74	-	0,74	0,63	1,02		0,74			
4	\bar{X}	3,40	6,40	-	12,80	18,20	18,80	-	19,60	-	-	-
	σ_n	0,48	0,49		0,74	0,75	0,75		0,80			
5	\bar{X}	3,80	8,20	-	15,00	20,00	22,20	-	22,40	-	-	-
	σ_n	0,40	0,75		0,63	0,63	0,75		0,50			
6	\bar{X}	3,40	6,80	-	10,20	13,00	14,80	-	14,80	-	-	-
	σ_n	0,48	0,75		0,98	1,09	0,75		0,75			



TABLA 10.- Análisis de diferencias entre medias, procedentes de la tabla 9, por la T de Student en función del tiempo de cultivo.

DIA 16-17 DE CULTIVO							DIA 20 DE CULTIVO						
TRATAMIENTOS							TRATAMIENTOS						
t	1	2	3	4	5	6	t	1	2	3	4	5	6
1	-	-3,4774 **	-3,4187 **	-8,0622 ***	-10,6114 ***	-7,6202 ***	-	-3,0421 *	-23,7152 ***	-29,1299 ***	-33,8314 ***	-12,0157 ***	
2		-	0,3477 -	-3,0813 *	-6,1479 ***	-3,4582 **		-	-16,5660 ***	-22,0718 ***	-28,0701 ***	-8,8257 ***	
3			-	-4,0311 **	-7,2158 ***	-4,2446 **			-	-7,3053 ***	-12,5487 ***	3,552 **	
4				-	-4,4927 **	-0,9984 -				-	-4,1092 **	8,7881 ***	
5					-	2,9515 *					-	12,4328 ***	

DIA 22-23 DE CULTIVO							FINAL CULTIVO (ESTABILIZACION)						
t	1	2	3	4	5	6	t	1	2	3	4	5	6
1	-	-4,2847 **	-20,2285 ***	-22,4962 ***	-29,7120 ***	-14,0071 ***	-	-7,8738 ***	-18,5278 ***	-17,0656 ***	-31,6228 ***	-5,9537 ***	
2		-	-11,8624 ***	-11,8946 ***	-17,0794 ***	-5,7948 ***		-	-6,0331 ***	-5,5199 ***	-11,8107 ***	2,8259 *	
3			-	1,4129 -	-4,5920 **	8,4776 ***			-	0,4104 -	-6,5098 ***	10,6114 ***	
4				-	-7,1678 ***	8,4327 ***				-	-6,6336 ***	9,7878 ***	
5					-	15,6006 ***					-	18,8533 ***	

*, **, ***, indican el nivel de probabilidad P= 0,05, 0,01 y 0,001 respectivamente.

las raíces de judías. Teniendo en cuenta la observación de Day et al. (1975), que el etileno endógeno puede inhibir la actividad nitrogenasa Trifolium subterraneum, se puede estar de acuerdo con que el proceso de nodulación y de fijación es muy sensible al etileno y que las inhibiciones severas se producen a concentraciones que generalmente se presentan en los suelos mal aireados (Smith y Dowdell, 1974). Otro factor que modificaría la liberación de etileno sería el nivel de nitrógeno y/o azufre en el medio de cultivo.

El etileno suministrado exógenamente inhibe la extensión radical en cereales (Smith y Robertson, 1971) y en algunas leguminosas (Grobbelaar et al., 1971; Ligeró et al., 1981). Sin embargo, no afecta al peso de la raíz, indicando que la pérdida de elongación fue compensada por un engrosamiento de la raíz (Goodlass y Smith, 1979). Este efecto es semejante al observado en la tabla 8 en la cual se expone el peso seco de las raíces de alfalfa inoculadas con Rhizobium meliloti y se observa que no existen diferencias importantes en el peso seco de la raíz para cualquiera de los tratamientos realizados respecto al testigo.

Los resultados expuestos ponen de manifiesto que el nitrógeno en el medio de cultivo induce la liberación de etileno endógeno radical y produce una inhibición de la nodulación (Awonaike et al., 1980), lo que lleva a pensar que puesto que el etileno inhibe la nodulación, el efecto inhibitor de los nitratos estaría mediado por el etileno producido por la raíz en respuesta a niveles elevados de nitrógeno en el medio de cultivo.

Los resultados de los experimentos tipo A, en los que se determinó el perfil de la actividad nitrogenasa específica, el número de nódulos y el peso seco de las plantas de alfalfa, se muestran en las tablas 11, 12 y 13 respectivamente. La tabla 11 se considera una tabla resumen de 8 tablas localizadas en el "addendum" (tablas XX a la

TABLA 11.- Actividad nitrogenasa específica de los nódulos de alfalfa, expresada en $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{tubo}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a lo largo del tiempo de cultivo y para cada tratamiento ensayado. Cada valor es media de 4 repeticiones.

TRATAMIENTO		DIAS DESPUES DE LA INOCULACION							
		11	16	21	26	31	37	43	49
1	\bar{X}	19,42	36,00	65,47	134,32	211,30	254,30	608,27	313,67
	%testigo	16	18	20	22	29	67	174	727
2	\bar{X}	28,61	66,09	206,32	255,42	362,60	902,90	644,92	217,52
	%testigo	24	33	64	42	49	236	184	504
3	\bar{X}	123,86	246,22	337,63	513,00	862,90	736,70	201,85	47,62
	%testigo	102	123	105	84	118	193	58	110
4	\bar{X}	119,05	321,62	353,05	623,10	1043,40	858,50	419,77	75,60
	%testigo	98	160	109	102	142	224	120	175
5	\bar{X}	147,03	278,72	423,92	590,62	952,50	769,90	406,06	68,25
	%testigo	121	139	131	96	130	201	116	158
6	\bar{X}	121,50	200,70	324,41	612,97	732,40	382,50	349,51	43,12
	testigo	100	100	100	100	100	100	100	100
N.P.		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	15,308	35,657	46,492	65,187	74,112	86,575	49,40	33,483
MDS	0,01	20,922	48,732	65,539	89,089	101,286	118,319	67,522	45,761
	0,001	28,576	66,561	86,786	121,683	138,342	161,607	92,255	62,503

XXVII, ambas inclusive). En esta tabla se incluyen los valores medios de la actividad nitrogenasa específica (4 repeticiones) detectada en los nódulos de alfalfa, en cada uno de los tratamientos ensayados y a lo largo del tiempo de cultivo, así como un extracto del análisis estadístico realizado.

En la tabla 12, resumen de 8 tablas, (XXVIII a la XXXV del "addendum" ambas inclusive) se indica el valor medio del número de nódulos radicales determinados en cada uno de los tratamientos realizados y en cada una de las medidas de actividad nitrogenasa, acompañado de una sinopsis del estudio estadístico realizado. El peso seco de la planta entera se expone en la tabla 13. En la tabla XXXVI del "addendum" se indica separadamente el peso de la raíz y parte aérea de las plantas de alfalfa.

El número de nódulos se afecta por la relación N/S en el medio de cultivo (como anteriormente se describió en la tabla 9 y figura 10). De nuevo se pone de manifiesto que en los tratamientos con una relación N/S alta (tratamientos 1 y 2) la nodulación es significativamente menor que en los demás tratamientos mientras que en los tratamientos 3, 4, 5 cuya relación N/S baja, la nodulación es bastante más elevada. Datos semejantes a los indicados anteriormente cuando se valoraba el etileno desprendido por las raíces.

También aquí para una mejor claridad, los resultados obtenidos se ha representado, en las figuras 11 y 12, la evolución de los tres parámetros indicados anteriormente, a lo largo del periodo de cultivo, en los tratamientos 1, 2 y 3 (figura 11) y 4, 5 y testigo (figura 12).

De los resultados obtenidos se puede observar que el peso de la planta para todos los tratamientos ensayados, es superior al del testigo. La intensidad de la respuesta disminuye con la relación N/S, aunque si se tiene en cuenta el resultado de la parte aérea y de la raíz por separado (tabla XXXVI del "addendum"), el incremento de la respuesta es

TABLA 12.- Número de nódulos formados en raíces de alfalfa inoculada en cada muestreo realizado, para los tratamientos ensayados. Cada valor es media de 4 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DIAS DESPUES DE LA INOCULACION							
		11	16	21	26	31	37	43	49
1	\bar{X}	6,00	9,00	10,75	12,00	13,75	12,25	12,00	12,00
	%testigo	86	112	66	80	90	75	69	70
2	\bar{X}	7,75	8,75	11,50	15,50	15,25	15,25	16,25	15,00
	%testigo	111	109	71	103	100	94	102	97
3	\bar{X}	8,75	10,50	18,00	22,25	25,50	21,25	19,25	22,50
	%testigo	125	131	111	148	167	131	120	145
4	\bar{X}	8,50	9,00	18,00	20,50	21,00	20,00	17,50	18,50
	%testigo	121	112	111	137	131	123	109	119
5	\bar{X}	9,50	11,00	18,50	23,00	22,50	22,00	19,75	21,00
	%testigo	136	138	114	153	142	135	123	135
6	\bar{X}	7,00	8,00	16,25	15,00	15,25	16,25	16,00	15,50
	testigo	100	100	100	100	100	100	100	100
N.P.		0,01	0,01	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	1,545	1,632	1,696	2,393	2,107	2,949	2,136	2,399
MDS	0,01	2,112	2,230	2,318	3,270	2,879	4,030	2,919	3,279
	0,001	2,885	3,046	3,167	4,467	4,933	5,505	3,987	4,479

tá relacionado con la parte aérea de la planta y no con la raíz; cuyos pesos secos determinados a lo largo del cultivo no muestran variaciones. Este efecto ha sido comentado anteriormente.

Los tratamientos con niveles de nitrógeno combinado altos, afectan negativamente la nodulación (Oghoghorie y Pate, 1971; Rabie et al., 1980) mientras que en los que el nivel de sulfatos es elevado se afecta positivamente (Oke, 1968; Wooding, 1970). En la mayoría de los tratamientos, incluso el testigo, la estabilización de los nódulos se obtiene hacia el día 20 después de la inoculación, esto es un hecho frecuente en los cultivos axénicos en tubos de ensayo. Sin embargo en los tratamientos con alto contenido en nitrógeno, la estabilización se alcanza algo después.

La fijación de nitrógeno, indicada por el test de la reducción de acetileno, alcanzó su máximo cuando el desarrollo de los nódulos estaba estabilizado en cada uno de los tratamientos ensayados. Una vez alcanzado el máximo, éste declinó rápidamente (figura 11 y 12). En todos los tratamientos la fijación de nitrógeno sigue el patrón del desarrollo del nódulo habiéndose descrito un efecto similar en nódulos de soja (Graham y Rosas, 1977) y judías (Franco et al., 1979).

Una aplicación de nitrógeno, como fertilizante, elevada (tratamiento 1 N/S = 5.0), reduce tanto el número de nódulos (tabla 12) como la actividad nitrogenasa específica (tabla 11). Este efecto es menos drástico a medida que el nivel de nitrógeno en el medio disminuye. Sin embargo los tratamientos con una relación N/S baja (elevado contenido de sulfatos en la solución nutritiva), la actividad nitrogenasa es mucho mayor que el testigo. Para este parámetro los óptimos se obtienen a unas relaciones N/S = 0,8, 0,4 y 0,2, correspondientes a los tratamientos 3, 4 y 5 respectivamente.

TABLA 13.- Peso seco expresado, en mg, de las plantas de alfalfa inoculadas, en cada tratamiento y a lo largo del período de cultivo, en los experimentos tipo A. Cada valor es media de 4 repeticiones.

TRATAMIENTOS	DIAS DESPUES DE LA NODULACION							
	11	16	21	26	31	37	43	49
1	37,26 [±] 1,26	38,75 [±] 1,41	50,00 [±] 1,83	50,00 [±] 1,73	53,50 [±] 0,77	57,25 [±] 1,34	63,75 [±] 2,75	65,00 [±] 2,90
2	37,81 [±] 1,25	38,75 [±] 1,23	45,00 [±] 1,43	50,00 [±] 2,96	49,05 [±] 0,78	58,50 [±] 1,24	61,25 [±] 2,40	63,75 [±] 2,25
3	35,53 [±] 0,66	35,10 [±] 0,93	47,50 [±] 1,46	50,00 [±] 1,61	52,50 [±] 2,29	57,50 [±] 1,88	61,25 [±] 2,86	63,75 [±] 2,95
4	35,53 [±] 1,75	37,50 [±] 1,29	43,75 [±] 1,80	45,25 [±] 2,11	48,50 [±] 1,73	52,20 [±] 2,06	60,00 [±] 2,94	62,50 [±] 2,43
5	29,73 [±] 0,59	31,25 [±] 1,26	36,25 [±] 0,87	41,25 [±] 1,64	42,50 [±] 1,64	43,75 [±] 1,85	55,00 [±] 2,38	57,00 [±] 2,56
6	23,83 [±] 0,90	23,50 [±] 0,98	31,25 [±] 0,96	32,25 [±] 0,96	32,75 [±] 1,09	33,75 [±] 1,71	38,75 [±] 1,75	44,00 [±] 1,82

En este tipo de cultivos, la ausencia de los nódulos aparece pronto y es característico que el periodo real de fijación de nitrógeno sea relativamente corto, pero efectivo en la incorporación de nitrógeno, como lo demuestra el incremento del peso seco de las plantas (tabla 12) respecto al testigo. El incremento de peso seco en los tratamientos 1 y 2 lógicamente debería ser atribuido al nivel de nitrógeno combinado en el medio de cultivo, (Bhangoo y Albritton, 1976) y no al fijado biológicamente.

El efecto beneficioso del azufre en la nodulación y en la fijación de nitrógeno ha sido comprobado por diversos autores (Gates, 1974; Rending y McComb, 1959). Sin embargo, los resultados de este estudio están de acuerdo con los que indican que un incremento en el suministro de azufre a partir de un determinado nivel, que en este caso se corresponde con el tratamiento 3, no incrementa significativamente el número de nódulos (Robson, 1979). En cambio la fijación de nitrógeno requiere más azufre, el máximo de actividad nitrógenasa se alcanza con 10.91 meq/l de sulfato en el medio de cultivo (tratamiento 4) y el máximo de nódulos con niveles algo menores.

Una adecuada dosis de nitrógeno y azufre puede ser importante en la formación de nódulos en raíces de alfalfa. Gibson (1977) ha revisado algunos factores fisiológicamente importantes que influyen en la formación y función de los nódulos, sin embargo, existe poca información disponible en cuanto a factores fisiológicos y nutricionales asociados con la fijación de nitrógeno en alfalfa.

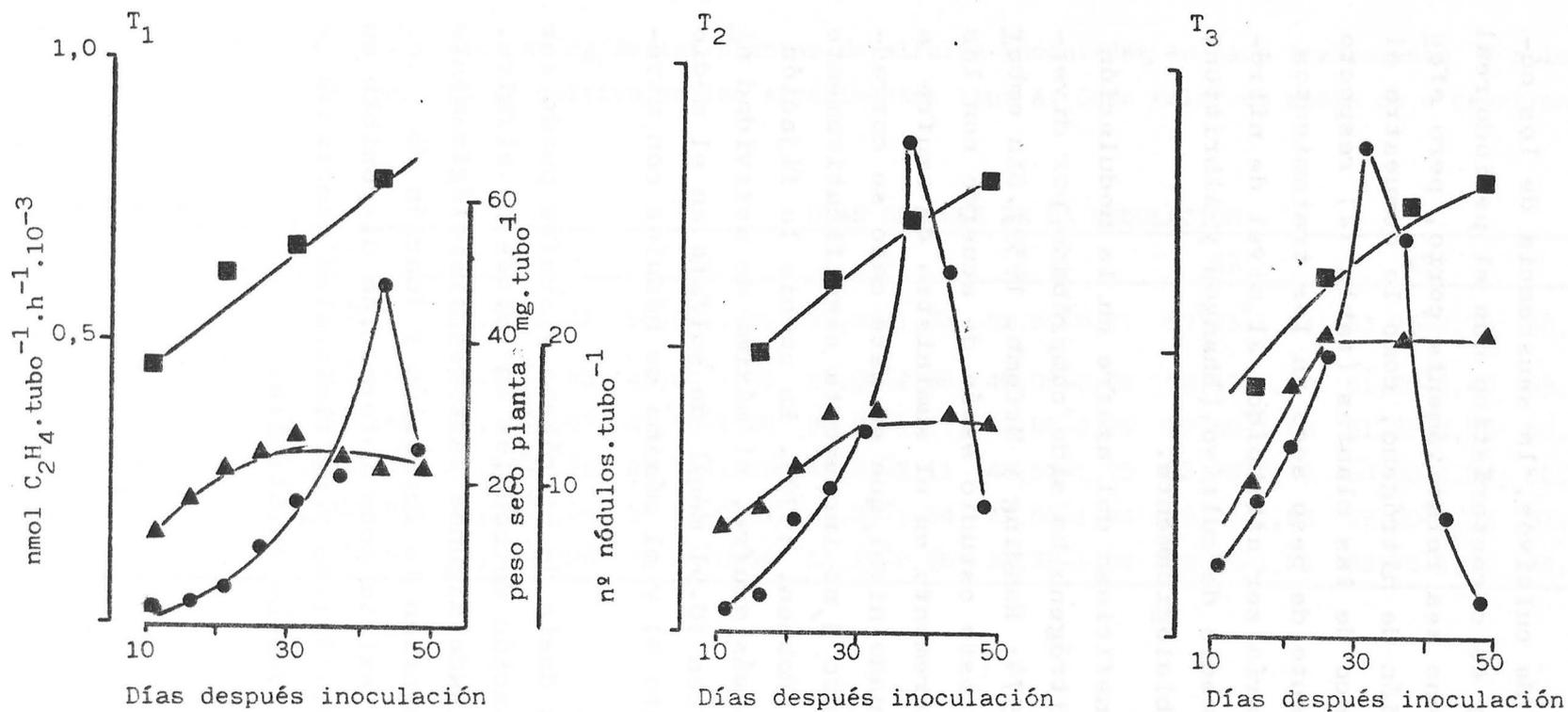


Fig. 11.- Actividad nitrogenasa específica (●); número de nódulos (▲) y peso seco de la planta de alfalfa (■) durante el período de cultivo. Tratamientos 1 (N/S= 5.0); 2(N/S= 1.6) y 3 (N/S= 0.80). Experimentos tipo A.

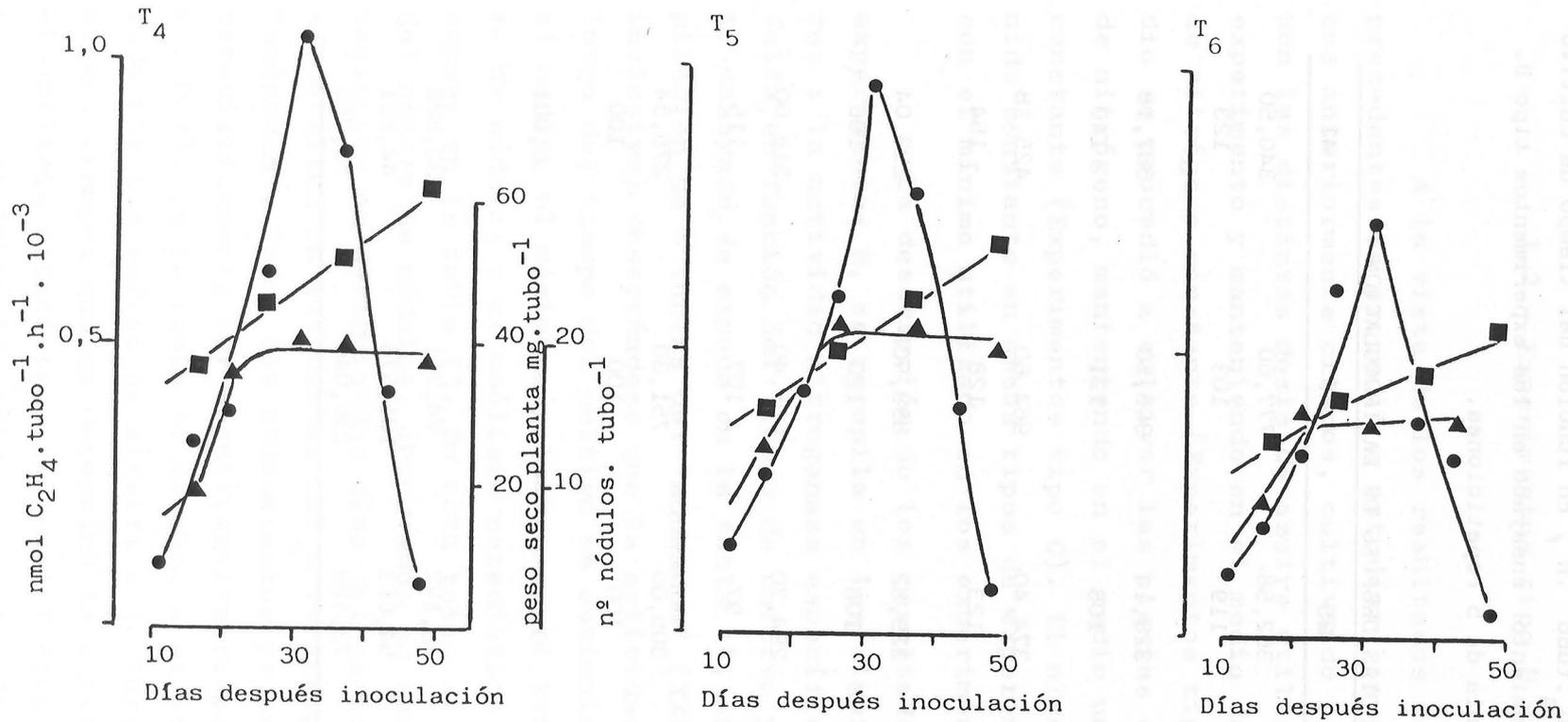


Fig. 12.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲) y peso seco de la planta (■), de alfalfa durante el período de cultivo. Tratamiento 4(N/S= 0,40), 5(N/S= 0,20) y 6(Testigo). Experimentos tipo A.

TABLA 14.- Actividad nitrogenasa específica de los nódulos de alfalfa, expresada en $\text{nm C}_2\text{H}_4 \cdot \text{tubo}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, en función del tiempo de cultivo y para cada tratamiento ensayado en los experimentos tipo B. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DIAS DESPUES DE LA INOCULACION			
		15	25	33	41
1	\bar{X}	127,20	362,58	777,60	340,50
	% testigo	109	119	103	123
2	\bar{X}	143,58	328,14	905,50	387,18
	% testigo	123	108	121	140
3	\bar{X}	122,46	374,40	964,60	425,18
	% testigo	105	123	128	154
4	\bar{X}	132,36	329,82	898,90	293,04
	% testigo	113	108	120	106
5	\bar{X}	144,22	294,70	805,40	318,00
	% testigo	123	97	107	115
6	\bar{X}	116,90	305,00	751,30	276,34
	testigo	100	100	100	100
N.P.		-	0,01	0,001	0,001
	0,05	-	40,172	74,731	32,828
MDS	0,01	-	54,603	101,576	44,621
	0,001	-	73,129	136,040	59,760

1.2.- Experimentos tipo B y C.

A la vista de los resultados de los experimentos - precedentes se procedió a estudiar los parámetros fisiológicos anteriormente citados, cultivando plantas de alfalfa - con las distintas dosis de azufre utilizadas en el primer experimento y manteniendo en el medio de cultivo un nivel de nitrógeno constante (Experimentos tipo B). En otro estudio se procedió a cultivar las plantas con distintas dosis de nitrógeno, manteniendo en el medio un nivel de azufre - constante (Experimentos tipo C). El nivel de elemento mantenido constante en ambos tipos de experimentos se equiparan con el mínimo utilizado en los experimentos A.

La descripción de los resultados obtenidos en los experimentos B, se recopila en las siguientes tablas y figuras : la actividad nitrogenasa específica en nódulos de alfalfa, en función del tiempo de cultivo y para cada tratamiento ensayado, se expone en la tabla 14, siendo ésta una recopilación de 4 tablas del "addendum" (XXXVII, a la XL ambas inclusive). observándose que la actividad nitrogenasa a lo largo del tiempo del cultivo se estimula con el sulfato en el medio, el máximo se alcanza en el tratamiento 3. El número de nódulos y el análisis estadístico correspondiente se expone en la tabla 15. En esta tabla se recopilan los datos del número de nódulos, observados en cada uno de los 6 tratamientos en determinados días del periodo de cultivo, que se detallan en las tablas XLI a la XLIV, ambas inclusive del "addendum". Todos los tratamientos presentan una respuesta estadísticamente muy significativa respecto al testigo ($P = 0,001$). En la tabla 16 se indica el etileno endógeno liberado por las raíces de alfalfa a lo largo del cultivo, a los mismos tiempos que se determinó la actividad nitrogenasa, y el análisis estadístico, al cual fueron sometidos estos datos, en la tabla 17. Asimismo se señala en la tabla 18, el

TABLA 15.- Número de nódulos formados en raíces de alfalfa, incoulada, en función del tiempo de cultivo y para cada tratamiento ensayado en los experimentos B. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DIAS DESPUES DE LA INOCULACION			
		15	25	33	41
1	\bar{X}	17,00	26,20	26,80	23,0
	% testigo	207	177	172	155
2	\bar{X}	16,40	27,80	27,20	23,60
	% testigo	200	188	174	159
3	\bar{X}	14,00	24,40	25,40	23,40
	% testigo	171	164	163	158
4	\bar{X}	17,00	23,00	24,80	23,40
	% testigo	207	155	159	158
5	\bar{X}	16,20	25,80	26,40	24,80
	% testigo	198	174	169	167
6	\bar{X}	8,20	14,80	15,60	14,80
	testigo	100	100	100	100
N.P.		0,001	0,001	0,001	0,001
MDS	0,05	1,475	2,032	1,456	1,622
	0,01	2,006	2,762	1,976	2,204
	0,001	2,686	3,699	2,651	2,952

TABLA 16.- Etileno liberado por raíces de alfalfa noduladas, expresado en $\text{nl C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en los muestreos realizados para los diferentes tratamientos en los experimentos tipo B.

DIAS DESPUES		TRATAMIENTOS					
INCOULACION	Repeticiones	1	2	3	4	5	6
Día 15	1	8,59	5,89	5,72	5,93	4,14	12,04
	2	9,78	6,51	5,99	5,70	3,95	11,34
	3	8,85	5,67	6,68	6,48	4,52	13,23
	\bar{X}	9,07	6,02	6,13	6,04	4,20	12,20
	σ_n	0,51	0,35	0,40	0,32	0,23	0,78
Día 25	1	11,94	9,94	14,70	13,28	13,42	21,00
	2	10,78	12,53	16,75	14,61	12,16	19,43
	3	9,34	11,27	12,34	11,87	10,78	18,16
	\bar{X}	10,69	11,24	14,59	13,25	12,12	19,53
	σ_n	1,06	1,05	1,80	1,11	1,08	1,16
Día 33	1	39,75	27,28	70,78	52,69	32,01	41,23
	2	35,15	34,35	60,22	46,72	29,81	34,81
	3	42,29	25,90	68,87	57,99	36,35	35,91
	\bar{X}	39,06	29,18	66,62	52,47	37,72	37,32
	σ_n	2,95	3,70	4,59	4,60	2,72	2,80
Día 41	1	9,91	10,85	13,89	10,43	11,06	19,02
	2	8,61	9,91	18,45	11,41	12,39	23,98
	3	9,28	10,61	16,35	11,13	11,38	19,27
	\bar{X}	9,26	10,46	16,23	10,99	11,61	20,76
	σ_n	0,53	0,40	1,86	0,41	0,56	2,28

TABLA 17.- Análisis de diferencias entre medias, procedentes de la tabla 16, por la T de Student en función del tiempo de cultivo.

DIA 15 DESPUES INOCULACION							DIA 25 DESPUES INOCULACION						
TRATAMIENTOS							TRATAMIENTOS						
t	1	2	3	4	5	6	t	1	2	3	4	5	6
1	-	8,5406	7,8565	8,7166	15,0771	-5,8173	-	-0,7150	-3,2337	-2,8890	-1,6367	-9,7439	
		**	**	***	***	**		-	*	*	-	***	
2		-	-0,3585	-0,0730	7,5269	-12,5205		-	-2,7844	-2,7885	-1,0119	-9,1770	
			-	-	**	***			*	*	-	***	
3			-	0,3043	7,2449	-11,9938			-	1,0975	2,0381	-3,9957	
				-	**	***				-	-	*	
4				-	8,0871	-12,6552				-	1,2638	-6,7749	
					**	***					-	**	
5					-	-17,0393					-	-8,0978	
						***						**	
DIA 33 DESPUES INOCULACION							DIA 41 DESPUES INOCULACION						
TRATAMIENTOS							TRATAMIENTOS						
t	1	2	3	4	5	6	t	1	2	3	4	5	6
1	-	3,6163	-8,7488	-4,2504	2,7367	1,0008	-	-3,1302	-6,2421	-4,4718	-5,2790	-8,5093	
		*	***	*	**	-		*	**	*	**	**	
2		-	-10,9994	-6,8333	-1,3352	-3,0385		-	-5,2530	-1,6026	-2,8944	-7,7069	
			***	**	-	*			**	-	*	**	
3			-	3,7715	11,0051	9,4388			-	4,7651	4,1195	-2,6666	
				*	***	***				**	*	*	
4				-	6,4012	4,8728				-	-1,5473	-7,3048	
					**	**					-	**	
5					-	-2,0410					-	-6,7504	
												**	

*, **, ***, indican el nivel de probabilidad $P = 0,05$, $0,01$ y $0,001$ respectivamente.

peso seco de las plantas de alfalfa en cada una de las tomas de muestras realizadas. En la tabla XLV, del "addendum" se ha estimado el peso seco de las plantas de alfalfa, considerándose el peso de la raíz separadamente de la parte aérea.

Por último se ha considerado oportuno presentar todos los parámetros determinados en este tipo de experimentos en las figuras 13 y 14. En la primera de ellas se pone de manifiesto la tendencia que presentan los 4 parámetros citados anteriormente a distintos tiempos después de la inoculación y para los 3 primeros tratamientos, mientras que en la figura 14 se presentan los datos obtenidos en los tratamientos 4,5 y testigo.

La adición de azufre al medio radical aumenta la nodulación (Janssen y Vitosh, 1974 ; Lluch et al., 1979) y se incrementa la actividad reductora del acetileno como se observa en la tabla 15 y 14 respectivamente. De todos los tratamientos ensayados, el 3 y 4 son en los que se desarrolla una actividad nitrogenasa más intensa. El máximo de esta actividad se alcanza el día 35, después de la inoculación, en todos los tratamientos ensayados, cuando ya los nódulos están estabilizados, a continuación se detecta el inicio de la senescencia del nódulo y la actividad nitrogenasa decae (Sprent, 1979).

El crecimiento de la planta se favorece con el suministro de sulfato pero no se observan diferencias entre los distintos tratamientos, debido quizás al tipo de cultivo hidropónico utilizado. Las limitaciones del crecimiento de la planta en estas condiciones pueden ser debidas a un inadecuado suministro de nitrógeno (Anderson y Spencer, 1950) principalmente al principio del cultivo cuando la fijación de nitrógeno todavía no es operativa por falta de fotosíntesis (Munns, 1977) y el nitrógeno en la solución nutritiva en este tipo de experimentos es escaso.

TABLA 18.- Peso seco, expresado en mg, de las plantas de alfalfa inoculadas, en cada tratamiento, a lo largo del período de cultivo en los experimentos tipo B. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS	DIAS DESPUES DE LA INOCULACION			
	15	25	33	41
1	31,46 [±] 1,60	36,74 [±] 1,85	47,60 [±] 2,50	57,76 [±] 2,76
2	31,40 [±] 1,50	37,88 [±] 1,75	47,54 [±] 2,53	60,75 [±] 3,10
3	29,14 [±] 1,40	38,46 [±] 1,85	49,96 [±] 2,35	58,83 [±] 2,85
4	29,68 [±] 1,45	37,84 [±] 1,75	51,94 [±] 2,55	58,48 [±] 3,25
5	29,10 [±] 1,35	38,68 [±] 1,95	48,90 [±] 2,10	57,86 [±] 2,55
6	22,19 [±] 1,15	27,40 [±] 1,55	33,45 [±] 1,65	44,67 [±] 1,95

Se ha descrito que niveles altos de nitrógeno inhiben la nodulación pero no limitan el crecimiento de la planta (Oghoghorie y Pate, 1971) y sobre todo, son más efectivos en el periodo de crecimiento vegetativo (Hill-Cottingham y Lloyd - Jones, 1980), por lo que algunos de los niveles de nitrógeno utilizados en estos experimentos, podrían limitar el crecimiento y no afectar la nodulación. Sin embargo en este trabajo no se detectan diferencias notables en el crecimiento de la planta, debido a la eficiente simbiosis que se alcanza.

La limitación del crecimiento por falta de nitrógeno (Munns, 1968 a) se refleja en el tratamiento testigo (tabla 18) aunque esta limitación podría estar relacionada con la gran liberación endógena de etileno por las raíces (Radim y Loomis, 1969), como se puede observar en la tabla 16 o en las figuras 13 y 14.

En este tipo de experimentos de nuevo se pone de manifiesto que el etileno desprendido por las raíces de alfalfa puede ser considerado como un componente crítico relacionado con el proceso de nodulación y la actividad nitrogenasa de los nódulos. Además del hecho demostrado anteriormente que puede actuar de "señal" en el inicio de la nodulación, también puede actuar de indicador en la actividad reductora del acetileno en plantas de alfalfa noduladas, dado el paralelismo existente entre el perfil de la actividad nitrogenasa y el etileno desprendido por las raíces a lo largo del periodo de cultivo, como se observa en las figuras 13 y 14. Podríamos estar de acuerdo con la hipótesis mantenida por algunos autores (Recalde Manrique y Díaz Miguel, 1981), según la cual la evolución de etileno estaría relacionada con determinadas etapas morfogénicas de la planta. En este proceso el momento de la máxima actividad fijadora de nitrógeno estaría modulada por esta hormona ya que se corresponde con un pico de etileno liberado por las raíces.

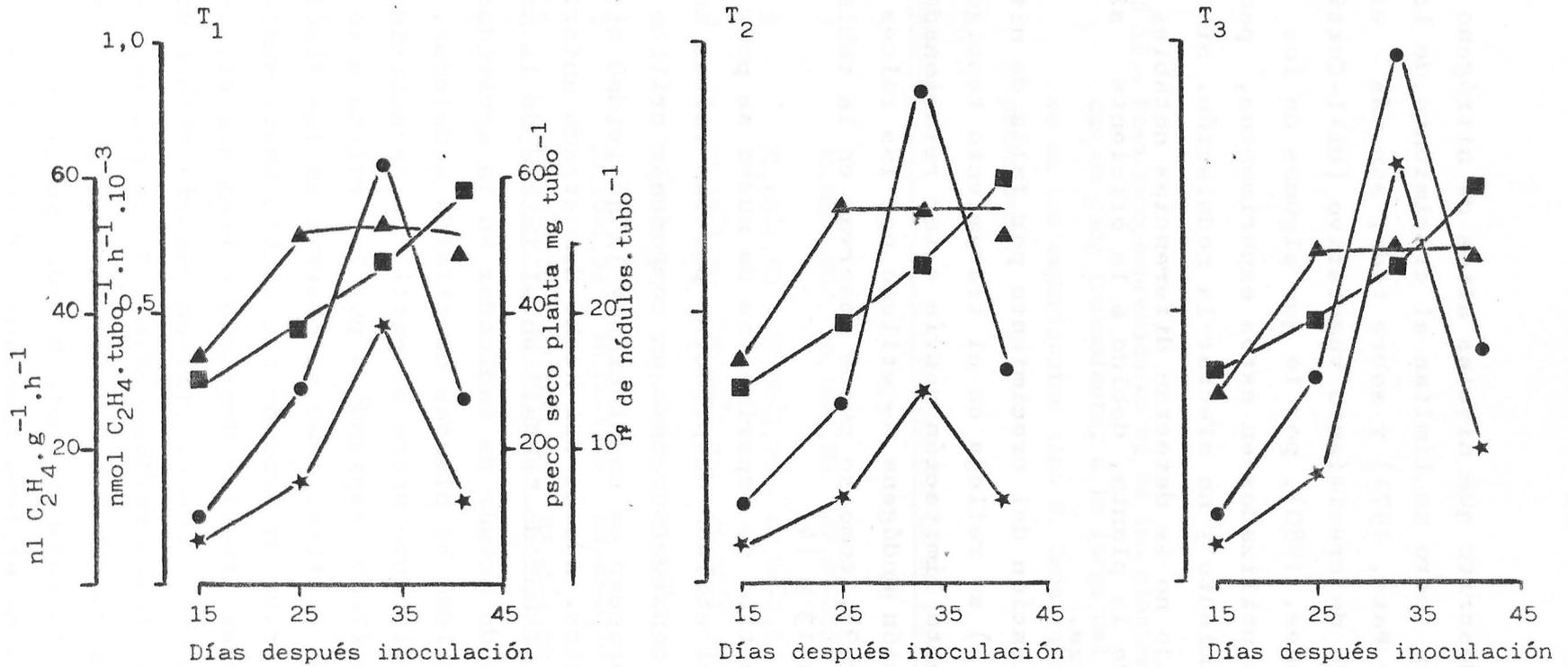


Fig. 13.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲), etileno liberado por las raíces de alfalfa (★) y peso seco total de la planta (■), a lo largo del período de cultivo. Tratamiento 1 (1S); 2(2S); 3 (3S) del experimento tipo B.

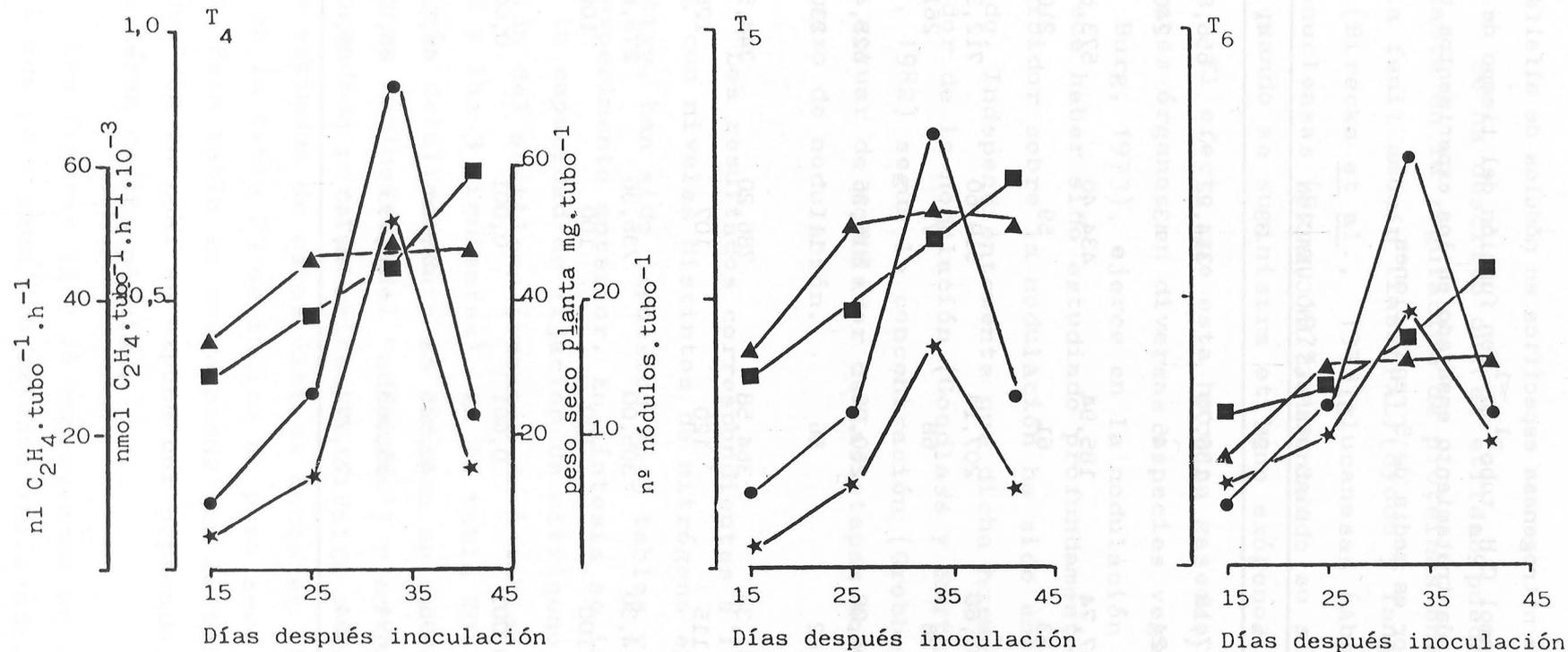


Fig. 14.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲), etileno liberado por las raíces (★) y peso seco (■) de plantas de alfalfa, a lo largo del período de cultivo. Tratamiento 4(4S); 5(5S) y 6(Testigo). Experimentos tipo B.

TABLA 19.- Actividad nitrogenasa específica en nódulos de alfalfa, expresada en $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{tubo}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, en función del tiempo de cultivo y para cada tratamiento ensayado en los experimentos tipo C. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DIAS DESPUES INOCULACION			
		15	25	33	41
1	\bar{X}	27,18	136,70	314,22	656,82
	% testigo	24	45	43	240
2	\bar{X}	37,74	185,94	434,40	573,66
	% testigo	33	61	59	210
3	\bar{X}	31,60	207,14	519,60	712,38
	% testigo	28	68	71	261
4	\bar{X}	94,08	260,96	816,36	628,44
	% testigo	82	86	111	230
5	\bar{X}	131,34	364,58	786,20	344,50
	% testigo	115	120	107	126
6	\bar{X}	114,30	305,00	735,36	273,66
	testigo	100	100	100	100
N.P.		0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	16,996	40,525	43,254	49,230
MDS	0,01	22,694	55,083	58,793	66,915
	0,001	30,394	73,772	78,740	89,618

Se ha descrito que el etileno puede tener un papel importante en la regulación de proteínas enzimáticas tales como la fenil amonio liasa (PAL) (Hyodo y Yang, 1971), peroxidases (Birecka et al., 1973), glucanasas (Abeles et al., 1971) y ribonucleasas (Pope, 1977) aumentando su síntesis y/o actividad cuando se suministra etileno exógeno.

El efecto que esta hormona gaseosa, producida por diferentes órganos en diversas especies vegetales (Abeles, 1973; Burg, 1973), ejerce en la nodulación de leguminosas, no parece haber sido estudiado profundamente, aunque su efecto inhibitorio sobre la nodulación ha sido anteriormente demostrado. Independientemente que dicha hormona actúe como -inhibidor de la nodulación (Goodlass y Smith, 1979; Lluch, et al., 1982) según la concentración (Grobbelaar et al., 1971) podría actuar de modulador de las etapas morfogénicas en el proceso de nodulación.

Los resultados correspondientes a los experimentos tipo C, con niveles distintos de nitrógeno en la solución de cultivo, han sido expuestos en 5 tablas y 2 figuras como en el experimento anterior. En síntesis se indica: en la tabla 19 la capacidad de fijación de nitrógeno estimada por la reducción del acetileno (resumen de 4 tablas del "addendum" la XLVI y las 3 siguientes). En la tabla 20, el número de nódulos (más detalladamente se exponen en las tablas L a la LIII ambas inclusivas del "addendum") y en la 21, el etileno desprendido por las raíces de alfalfa y el estudio estadístico estimado de estos últimos datos en la tabla 22. Por último en la tabla 23 se indica el peso seco total de las plantas. Esta tabla se corresponde con la tabla LIV del "addendum" en la cual se expone por separado el peso de raíz y parte aérea de las plantas.

Las figuras 15 y 16 representan un conjunto de 6 gráficas una para cada tratamiento realizado. En cada gráfica se expone la evolución de la actividad nitrogenasa espe-

TABLA 20.- Número de nódulos formados en raíces de alfalfa inoculadas en cada muestreo realizado y para los tratamientos ensayados en los experimentos tipo C. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS		DIAS DESPUES INOCULACION			
		15	25	33	41
1	\bar{X}	4,00	7,00	11,20	11,20
	% testigo	49	49	81	80
2	\bar{X}	3,00	9,20	15,80	15,40
	% testigo	37	65	114	110
3	\bar{X}	4,80	13,40	18,20	17,00
	% testigo	59	94	132	121
4	\bar{X}	6,40	19,80	21,00	18,60
	% testigo	78	139	152	133
5	\bar{X}	13,40	24,40	25,80	21,80
	% testigo	163	171	187	156
6	\bar{X}	8,20	14,20	13,80	14,00
	testigo	100	100	100	100
N.P.		0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	1,063	1,269	1,595	1,803
MDS	0,01	1,445	1,726	2,168	2,451
	0,001	1,936	2,311	2,904	3,283

cífica, el número de nódulos el peso seco de la planta y el etileno endógeno liberado por las raíces a lo largo del periodo de cultivo.

El tratamiento 4 es el que posee una actividad nitrogenasa específica máxima seguido del tratamiento 5, si bien no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos. En cambio ambos tratamientos resultan ser mejores que el testigo, sobre todo el 4 ($P = 0,001$). El máximo de esta actividad enzimática se presenta en estos tratamientos a los 30 - 35 días después de la inoculación como ya se había observado anteriormente (tabla 11 y 14), cuando se estabiliza el desarrollo de los nódulos radicales.

Sin embargo en los tratamientos 1, 2 y 3, se alcanza la máxima actividad nitrogenasa posteriormente, hacia los 45 días de cultivo después de la inoculación. Parece ocurrir que las plantas con mayor dosis de nitrógeno (tratamientos, 1, 2 y 3) muestran un retraso en la actividad nitrogenasa.

El nitrógeno combinado puede acelerar la senescencia del nódulo (Chen y Phyllips, 1977), resultados no confirmados en este estudio, al observarse que la actividad nitrogenasa se presenta después, en los tratamientos con niveles de nitrógeno altos. La vida del nódulo es limitada y la senescencia del nódulo puede producirse por una degradación o disminución de la leghemoglobina (Dilworth y Coventry, 1977) o por una reducción en la actividad nitrogenasa del nódulo. En el caso del nitrógeno combinado el cambio en la coloración debido a la degradación del pigmento rosado, parece ser secundario, afectando directamente a la actividad nitrogenasa del nódulo (Gibson, 1976). Sin embargo, según los datos recopilados en este estudio, la actividad nitrogenasa puede estar condicionada por la liberación de etileno inducida por el nitrógeno combinado del medio.

La inhibición de la actividad fijadora de nitrógeno, en la simbiosis Rhizobium - Leguminosa, por los nitratos u otros compuestos nitrogenados, ha atraído la atención

de numerosos investigadores durante muchos años (Dean y Clark, 1980; Wong, 1980). La disminución y retraso de la actividad nitrogenasa en plantas de alfalfa noduladas, producida por la adición de nitratos (tabla 19), puede estar originada por una disminución del número de nódulos (tabla 20) y de la leghemoglobina puesto que los nódulos eran blanquecinos. Esta caída provocada por la adición de nitratos hay autores que no la relacionan con una disminución en la cantidad potencial de la nitrogenasa activa (Houwaard, 1978), puesto que no afecta específicamente a la síntesis de la nitrogenasa (Bisseling et al., 1978), en contraste con los datos obtenidos para otros fijadores de nitrógeno (Shah et al., 1972; Tubb y Postgate, 1973), sino que se provoca como resultado de la interacción con otros procesos fisiológicos de la planta (Houwaard, 1980).

En este trabajo se pone de manifiesto que el etileno liberado por las raíces de las plantas de alfalfa puede intervenir en el mecanismo de control de la fijación de nitrógeno. La evolución del etileno liberado por las raíces de las plantas (tabla 21) sigue un perfil semejante al presentado por la actividad nitrogenasa específica a lo largo del cultivo (tabla 19), como ocurría en los experimentos tipo B. La fertilización nitrogenada retrasa el pico de fijación de nitrógeno en alfalfa, efecto observado en planta de haba y soja por Dean y Clark (1980). Asimismo, la fertilización nitrogenada retrasa el pico de etileno, que dirige o modula la actividad nitrogenasa. Estos resultados estarían en la línea anteriormente mencionada de considerar a esta hormona como un modulador de respuestas morfogénicas (Lieberman y Kunishi, 1970).

El etileno producido por las raíces puede inhibir la nodulación (Small et al., 1968) y la fijación de nitrógeno (Hardy et al., 1973). En el presente trabajo se encuentra que las plantas que liberan más etileno producen menos nódulos (Drennan y Norton, 1972) pero además se observa una

TABLA 22.- Análisis de diferencias entre medias, procedentes de la tabla 21, por la T de Student en función del tiempo de cultivo y los tratamientos ensayados.

DIA 15 DESPUES INOCULACION							DIA 25 DESPUES INOCULACION						
t	TRATAMIENTOS						t	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
1	-	3,3985	1,9920	4,2895	8,4244	5,6891	-	6,2954	7,3656	9,9555	11,4610	7,0647	
		*	-	*	**	**		**	**	***	***	**	
2		-	-1,9269	1,4367	7,3477	3,3753		-	0,0342	3,0614	5,3282	0,3388	
			-	-	**	*			-	*	**	-	
3			-	2,7996	8,0997	4,5315			-	4,9056	7,6485	0,4141	
				*	**	*				**	**	-	
4				-	5,0560	1,8289				-	4,0039	-3,2406	
					**	-					*	*	
5					-	-2,8197					-	-5,8211	
						*						**	
DIA 33 DESPUES INOCULACION							DIA 41 DESPUES INOCULACION						
t	TRATAMIENTOS						t	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
1	-	5,429	4,6371	-8,4007	-1,3903	-0,2404	-	0,2134	2,8304	14,5133	16,8341	14,9070	
		**	**	**	-	-		-	*	***	***	***	
2		-	-0,7983	-11,5163	-5,3762	-5,4639			-	2,7077	15,2718	17,7991	15,7099
			-	***	**	**				-	***	***	***
3			-	-11,1042	-4,8371	-4,7110				-	14,2827	17,3910	14,8325
				***	**	**					***	***	***
4				-	6,6640	8,1707					-	9,7222	1,1894
					**	**						***	-
5					-	1,1764						-	-10,0260
						-							-

*, **, *** indica el nivel de probabilidad P= 0,05, 0,01 y 0,001 respectivamente.

correlación positiva entre el etileno desprendido por las raíces y la fijación de nitrógeno, obteniéndose en principio algo diferente a lo esperado. Esta anomalía se resuelve si se asume que la información que se tiene procede de experimentos realizados anteriormente con ex planta (Chadwick y Burg, 1970), que producen etileno en proporciones elevadas, y/o en sistemas cerrados, originándose concentraciones de etileno distintas a las fisiológicas (Grobbelaar et al., 1971).

El nitrógeno combinado puede afectar todos los estadios de la infección y nodulación (Dart, 1974). Los datos de la tabla 20 indican como disminuye el número de nódulos en raíces de Medicago sativa infectadas por Rhizobium meliloti a medida que es mayor la concentración de nitratos en la solución mineral. En esta simbiosis Munns (1968 b) observó que los nitratos reducen la producción de pelos radicales y el "curling".

La aplicación de nitratos parece disminuir la capacidad de las plantas para la formación de nódulos. Dazzo y Brill (1978) demostraron que el nitrato exógeno reduce los niveles de lectinas en la superficie de los pelos radicales de trébol, lo cual evita la adhesión de Rhizobium. Sin embargo, no sabemos si este mecanismo de reconocimiento podría servir para explicar la reducción en el número de nódulos observados en la alfalfa objeto de estudio.

Los datos aquí expuestos ponen de manifiesto que el nitrógeno combinado afecta negativamente a la nodulación como ha sido descrito en bibliografía. Sin embargo, si se comparan los resultados obtenidos para los distintos tratamientos en la tabla 20 respecto al testigo, se observa que determinados niveles de nitrógeno, los más inferiores, favorecen la nodulación. Esto podría ser debido a los sulfatos del medio de cultivo que incluso en dosis pequeñas, (50 μ M) de azufre, favorecen la fijación simbiótica (Zaroug y Munns, 1979). También se podría pensar, en contra de la opinión ge

TABLA 23.- Peso seco, expresado en mg, de las plantas de alfalfa inoculadas en cada tratamiento realizado, a lo largo del período de cultivo, en los experimentos tipo C. Cada valor es media de 5 repeticiones.

TRATAMIENTOS	DIAS DESPUES DE LA INOCULACION			
	15	25	33	41
1	24,12 [±] 1,25	46,73 [±] 2,35	55,88 [±] 2,75	59,62 [±] 3,15
2	26,22 [±] 1,22	40,82 [±] 2,06	54,50 [±] 2,55	61,00 [±] 2,95
3	26,74 [±] 1,35	38,20 [±] 2,10	50,40 [±] 2,60	59,20 [±] 3,25
4	23,85 [±] 1,32	37,06 [±] 1,65	50,50 [±] 2,84	54,25 [±] 2,86
5	29,10 [±] 1,50	38,68 [±] 1,89	48,90 [±] 2,66	57,86 [±] 3,25
6	17,88 [±] 0,87	28,64 [±] 1,64	34,28 [±] 2,12	44,65 [±] 2,34

neral, que determinados incrementos de nitrógeno suministrado a las raíces pueden favorecer la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Al estudiar los datos obtenidos para el peso seco de la planta (tablas 23 y LIV del "addendum") en los distintos tratamientos realizados, se puede observar que en todos ellos dicho parámetro es superior al testigo.

Todos los resultados ponen de manifiesto que la fijación biológica, como única fuente de nitrógeno, no es suficiente para soportar un óptimo crecimiento de la planta. Esto podría ser en gran parte debido a que en estas condiciones la simbiosis alcanzada no es lo suficientemente efectiva. En cambio, suministrando determinados niveles de nitratos a la planta en el inicio del cultivo se obtiene una simbiosis mucho más vigorosa, lo que produce un crecimiento mayor de la planta, equiparable al obtenido en plantas cultivadas con altos niveles de nitratos. También se pone de manifiesto que el efecto inhibitorio de los niveles elevados de nitratos en el proceso de nodulación, podría deberse al etileno producido por la raíz en respuesta a estos niveles. Esta hormona podría ser la responsable de la disminución y malformación de pelos radicales, disminución de lectinas y otros efectos observados al adicionar nitratos a la planta. Por último, el etileno también parece regular o modelar de alguna forma, la actividad reductora del acetileno en los nódulos radicales de alfalfa.

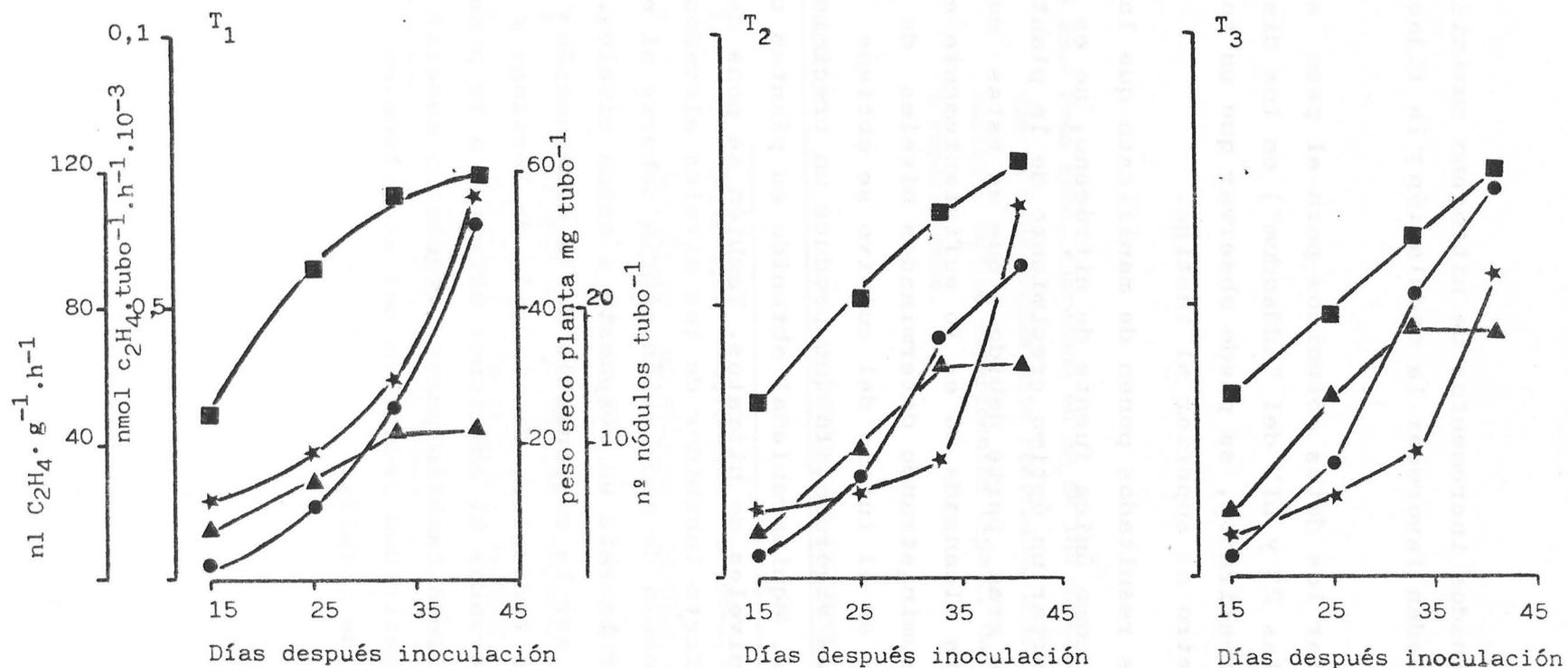


Fig. 15.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲), etileno liberado por las raíces (★) y peso seco total de la planta (■), a lo largo del período de cultivo. Tratamiento 1(5N); 2(4N) y 3(3N). Experimentos tipo C.

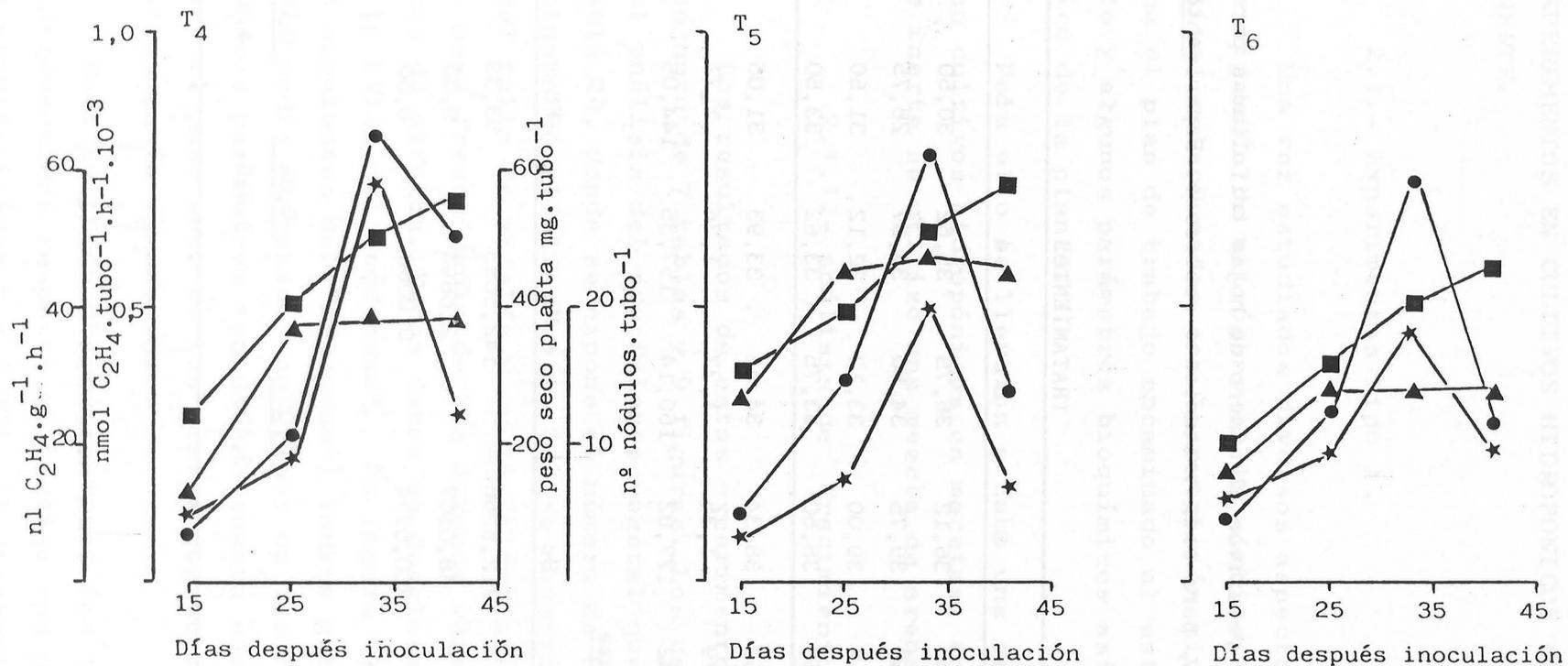


Fig. 16.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲), etileno liberado por las raíces (★) y peso seco de la planta (■), a lo largo del período de cultivo. Tratamiento 4(2N); 5(1N) y 6(Testigo). Experimentos tipo C.

Tabla 24.- Resultados relativos al número de hojas trifoliadas por planta - de alfalfa, para cada tratamiento realizado. Experimentos A.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	37,00	36,12	36,75	35,62	30,50	21,62
2	33,50	39,75	34,50	34,37	28,75	22,00
3	38,12	39,00	33,12	32,12	31,50	22,25
4	37,50	38,50	33,75	33,62	33,50	20,37
Media	36,53	38,34	34,53	33,93	31,06	21,56
Desv. típica	1,79	1,35	1,37	1,26	1,71	0,72
% testigo	169,42	177,82	160,14	157,35	144,05	100,00

Análisis de la varianza

Fc	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	712,5266	142,5053	53,38	0,001
Error	18	48,0507	2,6694	0,00	
Total	23	760,5774	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos	2,426	3,315	4,528

2. EXPERIMENTOS EN CULTIVOS HIDROPONICOS CON SOPORTE INERTE.

2.1.- Experimentos Tipo A.

Una vez estudiados diversos aspectos fisiológicos de la fijación de nitrógeno en la simbiosis R. meliloti - M. sativa, relacionados con la nutrición mineral, se puso en marcha el plan de trabajo encaminado al estudio del crecimiento y algunos parámetros bioquímicos así como el análisis químico de la planta.

Para ello se llevaron a cabo una serie de experimentos en cultivos hidropónicos en macetas. Como material de soporte inerte se utilizó una mezcla de arena y perlita.

2.1.1.- Análisis de Crecimiento.

Los resultados de estos experimentos se muestran en el conjunto de 7 tablas y 9 figuras. Los datos correspondientes al análisis del crecimiento vegetal quedan reflejados en la tabla 24, donde se expone el número de hojas trifoliadas por planta de alfalfa, en la 25, se muestra la longitud media del tallo de alfalfa y en la 26, tabla resumen, se expone el peso fresco medio de los órganos vegetativos de las plantas de alfalfa. Estos datos se desglosan en las tablas LV a la LVIII del "addendum". La figura 17 (tablas IX y las 3 siguientes del "addendum") indica gráficamente el peso seco medio expresado en gramos de los órganos vegetativos. Otros parámetros tenidos en cuenta son el número de nódulos y el peso seco de los mismos que se recopilan junto con otros en la figura 18.

Como se puede observar, todos los tratamientos se ven incrementados respecto al testigo con diferencias altamente significativas $P = 0,001$. Al disminuir el nitrógeno -

Tabla 25 .- Resultados relativos a la longitud total de tallos por planta de alfalfa, en cm, para cada tratamiento ensayado. Experimentos A.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	60,62	63,00	71,25	66,62	72,62	48,62
2	60,37	65,50	60,37	72,25	71,25	50,75
3	62,75	61,75	64,50	65,75	71,12	49,50
4	64,00	66,87	62,12	62,23	76,50	45,75
Media	61,93	64,21	64,56	66,71	72,87	48,65
Desv. típica	1,50	2,01	4,12	3,01	2,17	1,84
% testigo	127,29	132,12	132,69	137,11	149,77	100,00

Análisis de la varianza

Fv	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	1288,4902	257,6980	26,13	0,001
Error	18	177,5038	9,8613	0,00	
Total	23	1465,9940	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	0,05	0,01	0,001
Tratamientos	4,663	6,372	8,704

Tabla 26.- Peso fresco de hojas, tallo, parte aérea y raíz, expresado en g, - de plantas de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimentos A.

TRATAMIENTOS		PESO FRESCO			
		Hoja	Tallo	Parte aérea	Raíz
1	\bar{X}	6,94	5,76	12,71	14,06
	%	163	177	169	220
2	\bar{X}	7,10	6,09	13,19	13,34
	%	166	187	175	209
3	\bar{X}	6,88	5,74	12,63	11,30
	%	161	176	168	177
4	\bar{X}	6,30	5,45	12,47	10,84
	%	147	167	162	170
5	\bar{X}	6,01	5,86	12,47	9,97
	%	141	180	162	156
6	\bar{X}	4,26	3,25	7,52	6,39
	%	100	100	100	100
Probabilidad		0,001	0,001	0,001	0,001
	0,05	0,423	0,526	0,778	1,716
M.D.S.	0,01	0,578	0,719	1,064	2,346
	0,001	0,790	0,982	1,453	3,204

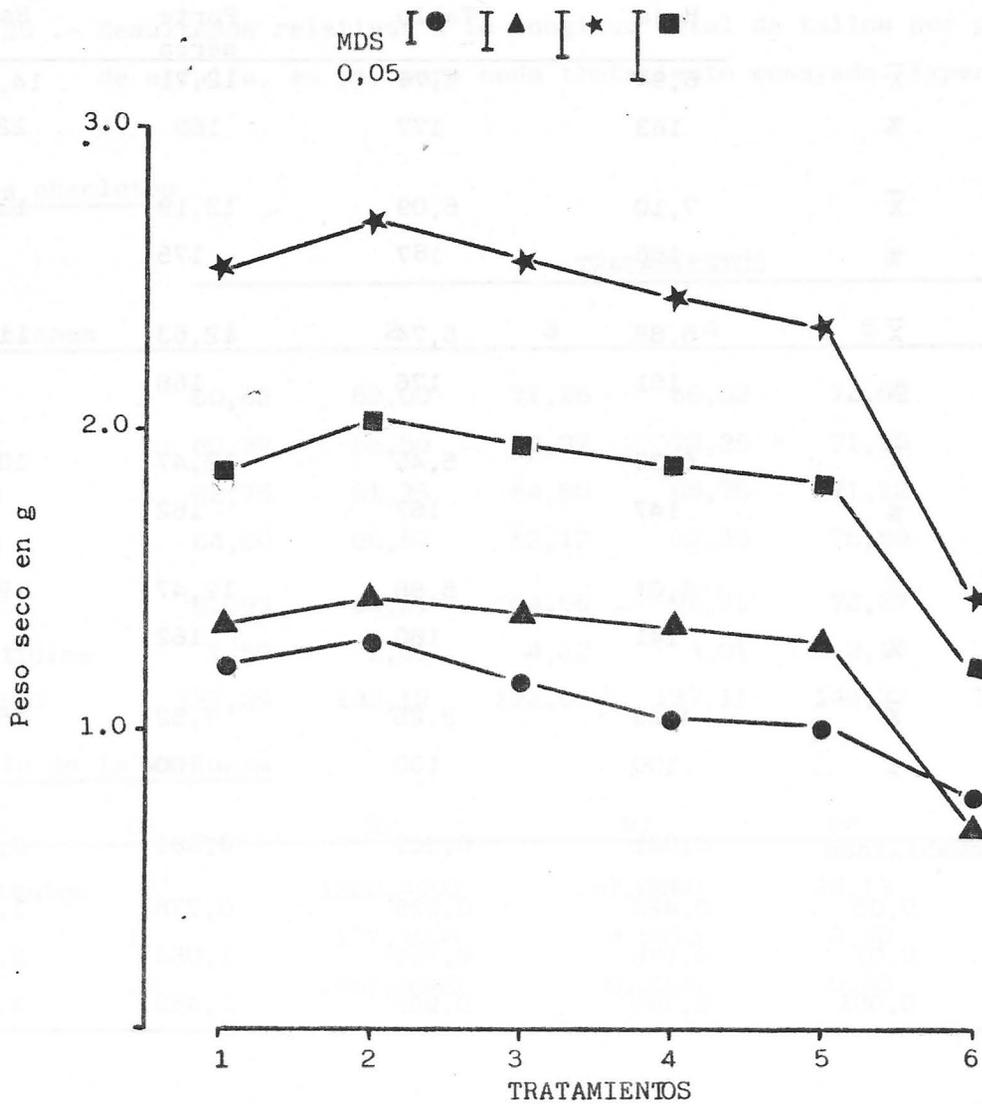


Fig. 17.- Peso seco medio de hoja (●), tallo (▲), raíz (■) y parte aérea (★) en cada tratamiento realizado. Experimento tipo A.

combinado en el medio disminuye el número de hojas, alcanzándose el máximo en el tratamiento 2.

El nitrógeno favorece el desarrollo de las hojas, (Lluch et al., 1984) de forma más notoria que el azufre, (Zaroug y Munns, 1979). Sin embargo, el comportamiento de ambos nutrientes en el crecimiento del tallo es distinto, el azufre favorece más espectacularmente la elongación del tallo que el nitrógeno, el máximo se obtiene en el tratamiento 5 (tabla 25). Al observar los resultados obtenidos del peso seco del tallo (figura 17), se mitiga la idea lanzada anteriormente del nitrógeno como elemento que afecta negativamente al crecimiento del tallo, puesto que el peso seco de éste, determinado en el tratamiento 2, es superior al obtenido para cualquiera de los otros tratamientos, incluyendo al testigo. Los resultados presentados muestran diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos y el testigo. Resultados similares han sido observados por Wedderburn (1983).

El azufre favorece la elongación del tallo en alfalfa, efecto descrito para otras leguminosas (Zaroug y Munns, 1979; Lluch et al., 1984), si bien este efecto no se observa en el peso seco, hace pensar que este elemento, influye negativamente en el diámetro del tallo.

Los cinco tratamientos empleados en este tipo de experimentos muestran diferencias altamente significativas ($P = 0,001$), frente al testigo (tratamiento 6) en los cuatro parámetros de crecimiento que se recopilan en la tabla 26 (peso fresco del tallo, hojas, parte aérea y raíz). Algo similar ocurre con los datos de peso seco obtenidos que pueden ser observados en la figura 17. En los cuatro parámetros de crecimiento, el tratamiento 2 ($N/S = 1,6$) muestra una ligera tendencia a ser el mejor. En este tratamiento el nivel de nitrógeno no es muy elevado y la simbiosis puede ejercer un efecto positivo. Los niveles altos de nitrógeno pueden producir alteraciones nutricionales, provocadas en este caso por unas deficiencias de azufre (Stewart

y Porter, 1969; Ligeró et al., 1981 b).

El tamaño del sistema radical puede condicionar la capacidad de absorción de la raíz, estando influenciado por el tipo de fertilización y por la fijación de nitrógeno - (Thornley, 1972). En las leguminosas la presencia de nódulos en las raíces añaden una complicación al problema, de hecho los sistemas radicales nodulados parecen ser metabólicamente más activos (Ryle et al., 1978) que los sistemas radicales que carecen de nódulos y utilizan el nitrógeno combinado. Esto sugiere que las leguminosas noduladas poseen generalmente un sistema radical distinto cualitativa y cuantitativamente, con una relación peso seco raíz / parte aérea mayor en los nodulados (Ryle et al., 1981).

Sin embargo, en experimentos anteriores se puso de manifiesto que las leguminosas noduladas tenían menos desarrollo radical que las tratadas con nitrógeno combinado, debido a la mayor liberación de etileno endógeno que inhibe el desarrollo radical (Ligeró et al., 1981 a). Resultados semejantes se observan en este trabajo. Se evidencia en estos resultados que existe una relación inversa entre desarrollo radical y peso seco de los nódulos, pues a medida que el peso seco de los nódulos disminuye, al aumentar la relación N/S en el medio de cultivo, el desarrollo radical aumenta.

Al estudiar la relación raíz / parte aérea en plantas de alfalfa crecidas con distintas relaciones N/S en el medio radical y con niveles de nodulación determinados, se observa que esta relación se incrementa a medida que los nódulos se desarrollan. Los datos encontrados para dicha relación son: Tratamiento 1 = 0,72; tratamiento 2 = 0,76; tratamiento 3 = 0,76 : tratamiento 4 = 0,76 y tratamiento 5=0,80. Al observar la figura 18 se pone de manifiesto que el número máximo y peso seco más alto de los nódulos corresponden al tratamiento 5 que coincide con el valor máximo alcanzado en la relación raíz / parte aérea.

La relación raíz/parte aérea parece reflejar el equilibrio funcional entre las diversas actividades de raíz y parte aérea en el ambiente en el cual crecen las plantas. Una deficiencia de nitrógeno incrementa la relación raíz / parte aérea mientras que cuando las plantas reciben altos niveles de nitrógeno esta relación puede disminuir (Clement et al., 1978).

Estos resultados pueden deberse a que las leguminosas noduladas utilizan una gran proporción de compuestos carbonados en el crecimiento de la raíz y del nódulo sin embargo el alto nivel de transporte contribuye a que su retención sea mínima en comparación con las plantas que reciben nitrógeno combinado. Esta conclusión está apoyada por los estudios de movimiento de asimilados en plantas de trébol (Ryle et al., 1981).

2.1.2. Nodulación y Fijación de Nitrógeno.

La influencia que la relación N/S del medio radical ejerce en el proceso de nodulación ha sido recopilada en la figura 18 en la cual se expone el número de nódulos, peso seco de los mismos, contenido en leghemoglobina y actividad nitrogenasa específica. Algunos de estos resultados se exponen más detalladamente en las tablas LXIII a la LXV del "addendum". Los cuatro parámetros están perfectamente correlacionados entre sí, presentándose el máximo en los tratamientos 4 y 5, que son los que llevan menor dosis de nitrógeno y mayor de sulfatos.

La actividad nitrogenasa, expresada en $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, aumenta sensiblemente al disminuir la relación N/S del medio. Sólo en el tratamiento 1 (N/S = 5.0) se obtienen valores inferiores al testigo, que crece en un medio carente de nitrógeno combinado. Esto indica que la adición de determinados niveles de nitrógeno, no sólo no inhiben la nodulación y fijación de nitrógeno sino que la poten

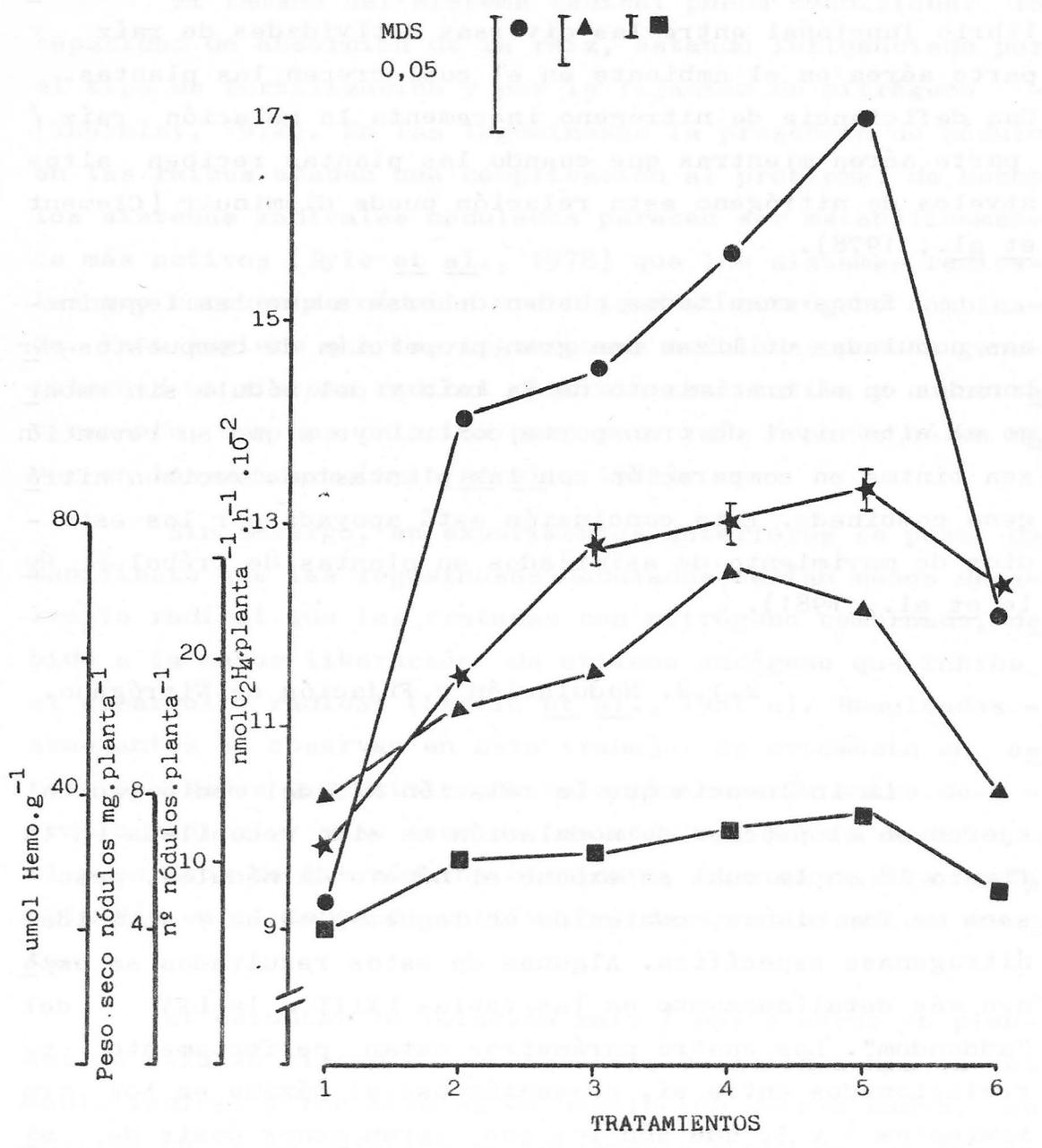


Fig. 18.- Actividad nitrogenasa espec\u00edfica (●), n\u00famero de n\u00f3dulos (▲), peso seco de n\u00f3dulos (■) y contenido en leghemoglobina (★) para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo A.

cian siempre que se asegure un adecuado suministro de azufre. La leghemoglobina se ha determinado tanto en μmol de hemo. g^{-1} p.f. de nódulos como en μmol de hemo. planta^{-1} , expresándose en la figura 18 de la primera forma. Se observa que en los tratamientos 1 y 2 se obtienen valores inferiores al testigo y a partir del tratamiento 3 se va aumentando el nivel de leghemoglobina, alcanzándose en el tratamiento 5 un 20 % más respecto al testigo. Respecto al número y peso de los nódulos se observa que las plantas mejor noduladas son las cultivadas con una relación N/S baja en el medio de cultivo y las peor noduladas se corresponden con el tratamiento 1 y testigo. Todos los tratamientos, excepto el 1, presentan diferencias positivas altamente significativas ($P = 0,001$) frente al testigo respecto al número de nódulos por planta.

En este trabajo se han observado que altos niveles de nitratos en el medio de cultivo afectan negativamente la actividad nitrogenasa específica y el contenido de leghemoglobina de los nódulos de raíces de alfalfa en simbiosis con R. meliloti. Oghoghorie y Pate (1971) trabajando con guisantes atribuyeron un efecto similar a la competencia por la fuente de carbono entre la fijación de nitrógeno y la asimilación de nitratos.

El proceso de nodulación y de fijación de nitrógeno requiere gran cantidad de fotosintato (Hardy y Havelka, 1976) por tanto, parece razonable asumir que la máxima biomasa nodular se alcance en el tratamiento con mayor peso y número de hojas (Van Kessel y Roscoski, 1981). Sin embargo, no es el efecto observado en este estudio puesto que la formación de nódulos está más relacionada con la relación de peso seco obtenida entre raíz y parte aérea, anteriormente comentada.

Los resultados muestran que el azufre es esencial en la nodulación de leguminosas (Oke, 1969; Lluch et al., 1979). Cuando aumenta en el medio de cultivo se produce un

incremento del peso y número de nódulos altamente significativo ($P = 0,001$). Sin embargo, cuando el nivel de nitrógeno presente es alto, aparecen menos nódulos (Dixon 1969; Dart, 1974), aunque la cosecha (figura 17) y el contenido de nitratos (figura 21) incrementa.

El efecto del nitrógeno y azufre del medio de cultivo, en el proceso de fijación de nitrógeno (nodulación, actividad nitrogenasa) es bastante semejante al observado cuando se utilizaron cultivos hidropónicos en tubos de ensayo, la máxima fijación de nitrógeno se alcanzó con valores de N/S bajos en la solución nutritiva. Los resultados de los experimentos en tubos de ensayo condujeron a conclusiones interesantes que pueden verse apoyadas por los datos obtenidos en experimentos con macetas.

Las investigaciones fisiológicas y bioquímicas realizadas en este campo coinciden en que los nitratos no son directamente quienes afectan a la fijación de nitrógeno sino productos de su reducción. Los nitritos, que se acumulan especialmente en ausencia de nitrito reductasa, podrían funcionar como un inhibidor de la actividad nitrogenasa en bacteroides (Rigaud et al., 1973) a través de su unión con la Mo - Fe proteína, componente I de la nitrogenasa (Trinchant, y Rigaud, 1980).

En los resultados expuestos en esta memoria se ha considerado otro factor que afecta la actividad nitrogenasa de los nódulos de las raíces, la leghemoglobina. Se ha encontrado (figura 18) una relación cuantitativa entre el contenido de leghemoglobina y la eficiencia fijadora de nitrógeno de los nódulos. Resultados similares fueron detectados por Bisseling et al. (1978).

La concentración del grupo hemo se determinó en preparaciones de proteínas solubles del nódulo. Se ha determinado el contenido de grupo hemo puesto que, en un extrato crudo de nódulos, el 70 % del total de hemo pertenece a la

leghemoglobina, como fue demostrado por Appleby (1974). De los datos obtenidos, se observa que la concentración de hemo se afecta por la relación N/S en la solución nutritiva, de forma similar a como se afecta la actividad nitrogenasa. Se podría pensar que el aumento de la actividad nitrogenasa que se produce, a medida que la relación N/S del medio disminuye, probablemente sea debido al incremento en el contenido de leghemoglobina en nódulos.

La función propuesta para la leghemoglobina ha sido facilitar el flujo de oxígeno (Bergersen, 1978) a concentraciones adecuadas para aumentar la eficiencia de la fosforilación oxidativa en el bacteroide sin inactivar la nitrogenasa (figura 4). Esto implica que una reducción de la cantidad de leghemoglobina en el nódulo puede disminuir la actividad nitrogenasa. Puesto que se ha demostrado la disminución de la concentración de hemo en nódulos de plantas cultivadas con relaciones crecientes de N/S, se podría postular que la disminución de la actividad nitrogenasa por los niveles de nitrógeno y azufre en el medio radical estaría provocada por una concentración baja de leghemoglobina.

2.1.3.- Determinaciones Bioquímicas.

Otros parámetros bioquímicos determinados han sido:

a) El contenido de clorofila en las plantas de alfalfa que se expone en la tabla 27. Los tratamientos que determinan contenidos más bajos en clorofila son el testigo y el tratamiento 1 y más alto el tratamiento 3, alcanzándose, solo un 20 % más de clorofila frente al testigo.

b) El nivel de azúcares totales solubles y reductores determinados en hoja, tallo y raíz de alfalfa, expresados en mg equivalentes de glucosa, g^{-1} se muestran en la tabla 28. Por diferencia se han podido determinar los azúcares no reductores solubles. Esta última tabla se considera

una tabla resumen, ya que ha sido elaborada teniendo en cuenta la tabla CVII y las 5 siguientes del "addendum". En la parte aérea de alfalfa, el acúmulo de azúcares reductores y totales va aumentando a medida que la relación N/S disminuye, efecto distinto al observado para el nivel de azúcares reductores en raíz. Esto podría indicar que los tratamientos con bajas relaciones N/S, tienen un metabolismo radical más intenso, impidiéndose que se acumulen los azúcares reductores. Estas plantas desarrollan mayor nodulación y menor peso seco radical, lo que sugiere que los nódulos, verdaderos sumideros metabólicos, pueden competir con la raíz por los fotoasimilados. Ello puede ser la causa del bajo peso radical con un mayor nivel de nodulación (Streeter, 1980). El estudio estadístico realizado para estos datos que se describen muestra un alto nivel de significación ($P = 0,001$).

c) También se ha determinado la actividad nitrato-reductasa en hojas, raíz y nódulos de alfalfa y expresado en $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y los resultados han sido expuestos gráficamente en la figura 19. En la elaboración de esta figura se han tenido presentes las tablas LXVI, LXVII y LXVIII que se recogen en el "addendum" de esta memoria. Este parámetro se determinó en los cinco tratamientos de los experimentos A, en macetas, pero no en el tratamiento testigo ya que no lleva fuente de nitrógeno combinado. En ensayos previos se observó que los niveles de actividad enzimática detectados, en el testigo estaban en el límite de sensibilidad del método. Además, no debemos olvidar que es un enzima inducible por su sustrato (Srivastava, 1980).

Tabla 27.- Contenido de clorofila en hojas de alfalfa, expresado en mg. g⁻¹, para cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo A.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	3,30	3,82	3,92	3,91	3,52	3,24
2	3,30	3,89	3,77	3,88	3,58	3,31
3	3,47	3,96	4,27	4,75	3,02	3,48
4	3,53	4,01	3,97	3,76	3,75	3,35
Media	3,40	3,92	3,98	3,82	3,72	3,34
Desv. típica	0,10	0,07	0,18	0,07	0,17	0,09
% testigo	101,64	117,18	119,05	114,27	111,21	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	1,438	0,287	13,02	0,001
Error	18	0,397	0,022	0,00	
Total	23	1,835	0,000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad		<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos		0,220	0,301	0,411

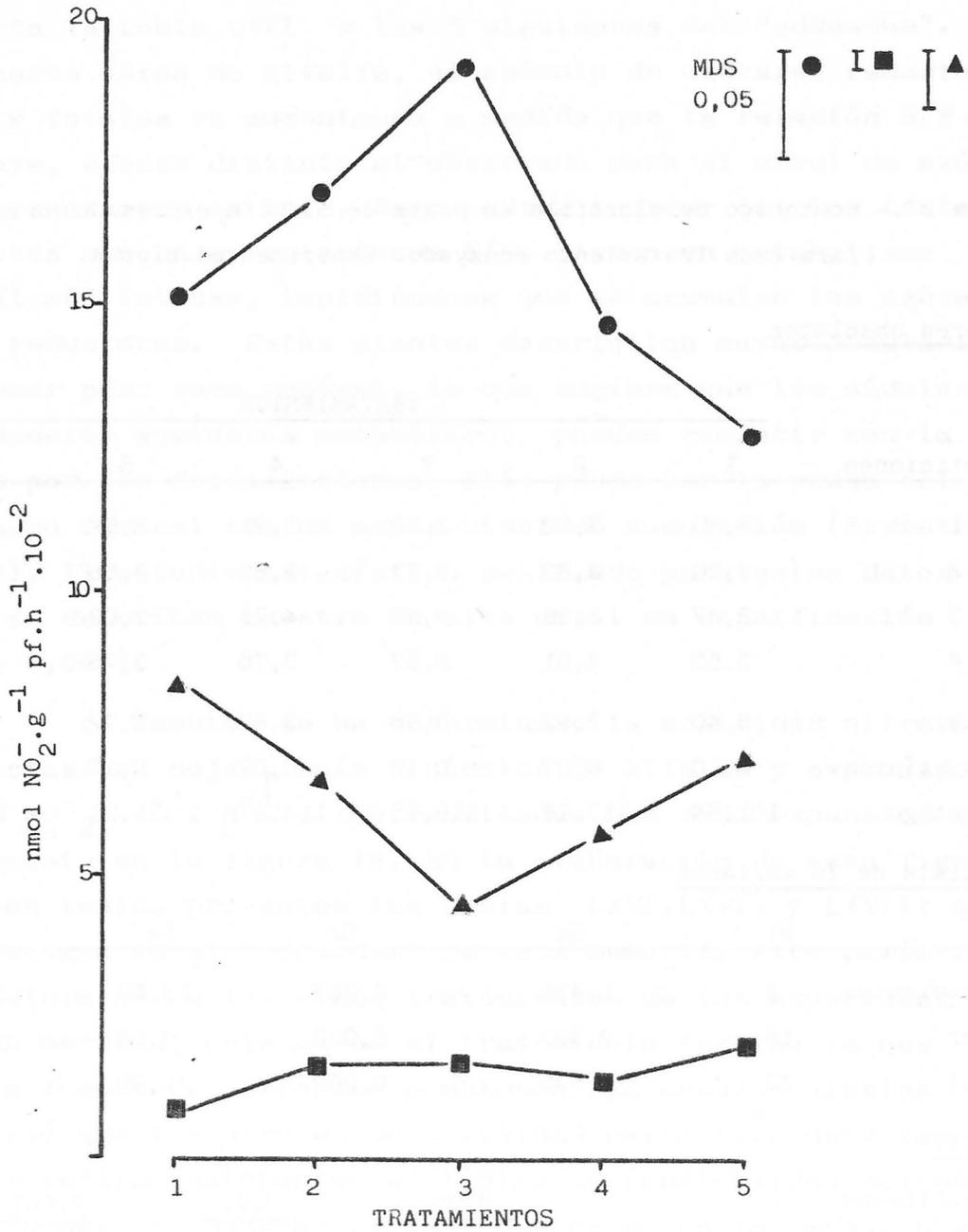


Fig. 19.- Actividad nitrato reductasa detectada en hoja (●), raíces (■) y nódulos (▲) de plantas de alfalfa sometidas a los distintos tratamientos. Experimentos tipo A.

Actividad nitrato reductasa.

Existen dos tipos de ensayos para determinar la actividad nitrato reductasa, el ensayo "in vitro" y el ensayo "in vivo", existiendo entre los diversos autores opiniones encontradas acerca de la sensibilidad de uno y otro.

En el ensayo "in vitro" el enzima se ensaya bajo óptimas condiciones que raramente se cumplen "in situ" (Lin y Kao, 1979). Además la presencia de inhibidores o proteasas podrian reducir la cantidad de proteina extraida e inhibir la actividad del enzima (Klepper et al., 1971; Schrader et al., 1974). Por otra parte dado que el ensayo "in vitro" requiere un considerable equipo de laboratorio, se podría pensar en el ensayo "in vivo" como una alternativa adecuada para la determinación de esta actividad enzimática.

El ensayo "in vivo" para la nitrato reductasa, ha sido utilizado por numerosos autores (Mulder et al., 1959 ; Ferrari y Varner, 1970; Jaworski, 1971; Klepper et al., 1971; Streeter y Bosler, 1972; Radin, 1973; Jones y Sheard, 1977). Segun Klepper et al., (1971) el ensayo "in vivo" presenta dos ventajas respecto al realizado en extractos libres de células : a) Permite el ensayo de la actividad enzimática en tejidos en los que la enzima es difícil de extraer; b) Proporciona un método rápido para medir la relación entre la reducción de nitratos y otros procesos paralelos como la fotosíntesis, respiración, etc. Sin embargo, Brunetti y Hageman (1976) pusieron de manifiesto que el ensayo "in vivo" está sometido a factores que pueden interferir en la reducción de nitratos, como son la concentración de sustrato, el nivel de enzima, la permeabilidad de la membrana y el reciclaje del NAD. Además, la liberación de nitritos parece estar afectada por el pH del medio de incubación (Jaworski, 1971; Jones y Sheard, 1977), y por la concentración del agente químico empleado para incrementar la permeabilidad de las membranas celulares (Jaworski, 1971; Radin, 1973).

A la vista de todo lo expuesto y teniendo en cuenta que se ha encontrado una correlación significativa entre los dos métodos y la acumulación de nitrógeno reducido en cultivos vegetales (Deckard et al., 1973), se llevaron a cabo distintos experimentos previos para elegir el tipo de ensayo más adecuado en este trabajo. Finalmente se optó por el ensayo "in vivo".

El ensayo "in vivo" utilizado está basado en los descritos por Heuer y Plaut (1978) y Mejías (1983) efectuados, en alfalfa y soja, respectivamente. Teniendo en cuenta que es un enzima inducible por su sustrato y es necesario ponerlos en contacto para lograr la máxima actividad, existen discrepancias respecto a como se logra ésta. Según Heuer y Plaut (1978) se obtiene un aumento de la actividad nitrato-reductasa cuando la incubación se hacía en presencia de altas concentraciones de iones, por ejemplo, cationes monovalentes. Sin embargo, este incremento se atribuye a un aumento en la permeabilidad de las membranas más bien que a la inducción por el sustrato o a un efecto osmótico (Aparicio Tejo y Sánchez Diaz, 1982). Según Mejías (1983) el método que permite la detección de una mayor actividad es el de la infiltración al vacío. Cuando esto va unido a la adición de propanol al 1 %, la liberación de nitrito aumenta en un 20%. Heuer y Plaut (1978) también citan el Triton X-100 como agente que incrementa la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, en este trabajo no se han empleado tales agentes químicos, con objeto de evitar las posibles alteraciones del metabolismo celular que puedan tener lugar. Se eligió como método de ensayo, la técnica de infiltración al vacío.

Se puede observar que este parámetro se afecta por la relación N/S en la solución nutritiva. La actividad nitrato reductasa en hoja alcanza el máximo en el tratamiento 3 (N/S = 0,80), mientras que en los tratamientos 1 y 2 con elevadas dosis de nitratos, se encuentran niveles que difieren muy poco de los obtenidos en los tratamientos con bajos

niveles de nitratos pero con un buen suministro de sulfatos (tratamientos 4 y 5). El nivel de actividad detectado en raíz es bastante despreciable frente al detectado en hojas, no obstante la nitrato reductasa detectada en la raíz, va aumentando con la disminución de la relación N/S. El máximo valor se alcanza en el tratamiento 5, el cual muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás tratamientos. En nódulos, los niveles de actividad son intermedios entre los alcanzados en hojas y en raíz. El comportamiento de la actividad nitrato reductasa encontrada en nódulos es inverso al observado en hojas.

La fijación biológica de nitrógeno y la asimilación de nitratos representan la mayor fuente de nitrógeno reducido para el crecimiento de las leguminosas. En general, suplementar la fijación biológica de nitrógeno con la incorporación de nitrógeno combinado, no ha sido una práctica usual para incrementar las cosechas (Hill-Cottingham y Lloyd-Jones, 1980). Sin embargo, bajos niveles de nitrógeno combinado se observa que aumentan la nodulación. Este nitrógeno será utilizado en los primeros estadios del crecimiento (Franco et al., 1979).

El proceso de asimilación de nitratos puede tener lugar en raíces o en la parte aérea dependiendo de la especie vegetal (Olday et al., 1976). En las plantas de alfalfa los nitratos se reducen fundamentalmente en la hoja, ya que el nivel de actividad nitrato reductasa encontrada en raíz es casi despreciable frente a la encontrada en hojas (figura 19). El máximo se alcanza cuando la relación N/S = 0,20, (tratamiento 5), indicando que para alcanzar una óptima nutrición nitrogenada es necesario emplear un adecuado suministro de nitrógeno y azufre. Los niveles elevados de nitratos (N/S = 5.0) no inducen la actividad enzimática como cabría esperar, algo semejante ocurre en guisantes, la actividad del enzima en la raíz no se afecta por los niveles de nitratos, en un amplio rango de concentraciones (Breteler

et al., 1979). Además, la absorción de nitratos no está acoplada a la actividad nitrato reductasa radical, al menos a concentraciones elevadas de nitratos (Breteler y Nissen, 1982).

En soja, los nitratos se reducen en raíz principalmente, mientras que en calabaza y algodón no ocurre lo mismo (Radin, 1978). En raíces de alfalfa se puede proponer que el sustrato no es un factor limitante ya que en raíces hay mayor acúmulo de nitratos que en hojas (figura 21). La baja actividad nitrato reductasa en las raíces de alfalfa indica que, aún cuando acumula nitratos en las raíces, la capacidad de éstas para transportar el nitrato por el xilema no se restringe. Resultados similares han sido descritos para el algodón (Radin, 1978). La distribución de esta actividad enzimática en raíces y hojas de alfalfa se podría explicar por la capacidad de transportar el nitrato en el xilema. Lauchli (1976) señala que hay 2 etapas separables en el paso de nitratos al xilema. La primera, la absorción desde el medio externo, dirigida por el nitrato (Pitman, 1977) y la segunda la secreción de los iones del simplasma al xilema (apoplasma) que es inhibida por la cicloheximina. Por tanto el transporte de los nitratos, de la raíz al tallo, depende del balance entre ambos procesos.

→ Otro factor que puede afectar la actividad del enzima y que explicaría la baja actividad nitrato reductasa en raíz, es la interacción anión-cación en el medio (Davidian y Salsac, 1979). La inducción del enzima depende de la velocidad del flujo de entrada del nitrato a los tejidos radicales (Butz y Jackson, 1977), del catión acompañante y de los aniones del medio (Robin et al., 1979). Así Kirkby y Knight (1977) argumentan que la absorción de nitratos disminuye cuando se adiciona sulfato al medio, indicando que este anión puede afectar la absorción de otros elementos.

Los resultados encontrados para la actividad nitrato reductasa en hoja, cuando las plantas crecen en una solución con una relación N/S alta, no son los esperados. Además, en estos tratamientos se acumulan los nitratos en una gran proporción, como puede observarse en la figura 21. Aslan y Oaks (1975) encontraron un efecto contrario, observaron que aumentaba la actividad del enzima sin aumentar la acumulación de nitratos. Se podría pensar que el sulfato en el medio radical puede modificar sustancialmente la absorción neta de nitratos, y aumentar el "pool" de nitratos almacenados en la vacuola, por lo que no se induce la nitrato reductasa citoplasmática en hoja.

Los nódulos de las raíces de alfalfa reducen los nitratos, al detectar en ellos actividad nitrato reductasa, lo que supone una fuente adicional de nitrógeno reducido para la planta. La presencia de esta actividad en bacteroides de Rhizobium ha sido descrita en la bibliografía (Kennedy et al., 1975; Gibson, 1976; Gibson y Pagan, 1977). Por tanto, los nitratos pueden ser absorbidos y transportados a los nódulos donde son reducidos a nitritos que pueden inhibir la fijación simbiótica de nitrógeno (Munns, 1977).

Al observar los datos de actividad nitrato reductasa y nitrogenasa en los nódulos de alfalfa (figura 19 y 18) respectivamente, se comprueba que no existe correlación alguna entre ambas actividades enzimáticas. La presencia de una correlación significativa entre la actividad nitrato reductasa y la nitrogenasa había sido descrita en R. japonicum (Cheniae y Evans, 1960) y en R. meliloti (Sik et al., 1976), y se sugirió que podría llegar a ser utilizada como un ensayo rápido de selección de bacterias de gran efectividad (Bordeleau y Antoun, 1978). Sin embargo, Antoun et al. (1980) tampoco encuentran correlación significativa entre la actividad nitrato reductasa y el peso seco de las plantas de alfalfa, el cual refleja la actividad de la fijación simbiótica de nitrógeno de las razas ensayadas (Bordeleau et al.,

1977). Resultados semejantes han sido encontrados en los experimentos A.

Lo que parece ocurrir es que el comportamiento de la actividad nitrato reductasa en nódulos es inverso al observado para esta actividad en la hoja. A medida que la relación N/S en la solución de cultivo disminuye, hay menos nitratos, la actividad nitrogenasa aumenta y la actividad nitrato reductasa en nódulos disminuye paralelamente al sustrato, aunque a partir del tratamiento 3 el nivel de nitrato reductasa en nódulos aumenta, mientras que en hoja disminuye, aún cuando la relación N/S en el medio baja.

La inhibición de la nitrogenasa por nitratos ha sido atribuída a la formación de nitritos por la nitrato reductasa de los bacteroides (Gibson, 1976). Además estos pueden formar un complejo NO con la leghemoglobina (Virtian, 1955) e inhibir la unión de la leghemoglobina al O_2 , interfiriendo con el proceso de fijación de nitrógeno. Sin embargo las razas de Rhizobium, cuyos bacteroides pueden expresar la actividad nitrato reductasa, reaccionan de distinta manera al nitrato (Manhart y Wong, 1980).

Cuando la relación N/S es baja (tratamientos 4 y 5), los niveles de nitratos en el medio no inhiben la nitrogenasa que alcanza la máxima actividad. Puesto que la reducción de nitratos en hojas en estos casos es mínima, esta actividad enzimática en el nódulo, que es bastante apreciable, es potencialmente un aspecto importante de la economía del nitrógeno de la planta (Randall et al., 1978). La magnitud de la contribución de la nitrato reductasa del nódulo al nitrógeno total del sistema no puede ser estimada con los datos disponibles, sin embargo, debe contribuir a la economía del nitrógeno puesto que las plantas sometidas al tratamiento 4 y 5 cuyos niveles de nitratos en el medio son muy bajos, contienen más nitrógeno, tanto en parte aérea como en raíz (figura 20). A ello debe contribuir, sin duda, la fijación biológica de nitrógeno y la nitrato reductasa de los nódulos.

Contenido de azúcares totales solubles y reductores.

La relación N/S en el medio de cultivo afecta la concentración de azúcares totales solubles y azúcares reductores (tabla 28). Los azúcares no reductores siguen una tendencia semejante a los azúcares totales (Zaroug y Munns 1980), presentándose el máximo, tanto en raíz como en hoja y tallo en los tratamientos con valores bajos de la relación N/S en el medio de cultivo. Los niveles de los azúcares reductores están menos sujetos a fluctuaciones que los azúcares totales bajo regímenes nutricionales variables (Rending y McComb 1959).

Los niveles de azúcares totales en tallo son muy parecidos a los existentes en hoja. No hay que olvidar que los tallos de alfalfa son clorofílicos y llevan a cabo el proceso fotosintético. Tanto en hoja como en tallo los valores obtenidos de azúcares totales y reductores son inferiores al testigo excepto en el tratamiento 5 ($N/S = 0,2$). En la bibliografía se describe que niveles elevados de azufre aumentan la nodulación, así como el número y peso de nódulos (Zaroug y Munns, 1980), encontrándose el peso y número de nódulos mayor en las plantas con una mayor concentración de azúcares. Se podría pensar que la nodulación está influenciada por los niveles de azúcares que se pueden acumular en los órganos de reserva.

Al estudiar los factores que afectan la fijación de nitrógeno, el factor clave se relaciona con la disponibilidad de fotosintato a los nódulos procedente de las hojas (Hardy y Havelka, 1976), pudiendo ser utilizado directamente en el crecimiento y en la fijación de N_2 . Sin embargo, no hay que olvidar que Allison (1935), hace 50 años, concluyó que la cantidad de nitrógeno fijado por las leguminosas, crecidas bajo condiciones en principio favorables para

Tabla 28.- Contenido de azúcares totales solubles y reductores, expresado en mg.g⁻¹, de hoja, tallo y raíz de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo A.

TRATAMIENTOS		AZUCARES TOTALES SOLUBLES			AZUCARES REDUCTORES		
		Hoja	Tallo	Raíz	Hoja	Tallo	Raíz
1	\bar{X}	6,68	6,75	6,64	3,25	3,02	1,86
	%	81	86	102	76	82	165
2	\bar{X}	7,40	7,76	6,75	3,32	3,11	1,62
	%	90	99	104	77	84	144
3	\bar{X}	8,03	8,08	7,24	3,36	3,67	1,50
	%	97	103	111	78	99	133
4	\bar{X}	8,32	8,25	9,06	3,49	3,78	1,45
	%	101	105	139	81	102	129
5	\bar{X}	9,76	8,46	8,06	5,11	4,15	1,08
	%	118	107	124	119	113	96
6	\bar{X}	8,25	7,87	6,51	4,29	3,69	1,12
		100	100	100	100	100	100
Probabilidad		0,001	0,01	0,001	0,001	0,01	0,001
0,05		0,881	0,726	0,865	0,349	0,566	0,221
M.D.S. 0,01		1,204	0,992	1,183	0,477	0,773	0,302
0,001		1,645	1,355	1,615	0,652	1,057	0,413

la fijación, no siempre se relacionaba con el nivel de carbohidratos suministrados. Está bastante documentado el hecho de que en leguminosas, una gran proporción de fotosintato es transportado y consumido en los nódulos, para el mantenimiento, fijación de nitrógeno y asimilación de amonio (Minchin y Pate, 1973; Ryle et al., 1979; Barta, 1982). Aunque hoy se tiende a considerar la suficiente oxigenación de los bacteroides, como uno de los factores limitantes principales, (Drevon y Salsac, 1984).

2.1.4. Análisis Químico de las Plantas.

Un tercer grupo de parámetros determinados en plantas de alfalfa crecidas en cultivos hidropónicos con soporte inerte, se refiere a la composición química de la planta. Este tipo de análisis se ha llevado a cabo en parte aérea y en raíz, recogiendo dichos datos en 6 figuras.

En el diagrama de barras de la figura 20 se recoge el nitrógeno determinado en la parte aérea y en raíz, expresado en % de materia seca y el total absorbido por la planta durante el cultivo. La figura 21 expone el nivel de nitrógeno en forma de nitratos detectado en las plantas de alfalfa. Estos diagramas se han obtenido de un conjunto de 8 tablas que se incluyen en el "addendum", comprendidas entre la LXIX y la LXXVI. Se han adicionado en el "addendum" dos tablas más, LXXVII y LXXVIII, que indican el nitrógeno total absorbido por las plantas de alfalfa (parte aérea y raíz respectivamente). En cada figura se observa una tendencia completamente distinta, mientras que el contenido de nitrógeno orgánico aumenta a medida que la relación N/S disminuye, presentándose el máximo en el tratamiento 4 y 5 en la parte aérea y raíz respectivamente, el nivel de nitratos disminuye con la relación N/S en el medio radical.

Se podría decir que el contenido de nitrógeno en forma nítrica en plantas de alfalfa apenas contribuye al nitrógeno total, sin embargo, podría tener una importancia cualitativa para conocer el metabolismo nitrogenado de la planta (Mills y Jones, 1979). También se pone de manifiesto que la fijación simbiótica (tratamiento T) determina una concentración de nitrógeno orgánico en la planta bastante semejante a la alcanzada cuando las plantas crecen en presencia de altos niveles de nitrógeno en forma de nitrato. De nuevo se ponen de manifiesto dos hechos : a) Los elevados niveles de nitrógeno pueden crear desequilibrios nutricionales que influyen en el uso óptimo del nitrógeno como fertilizante; b) las bajas relaciones N/S en el medio no inhiben la fijación biológica de nitrógeno y mejoran el metabolismo nitrogenado.

El azufre total determinado en las plantas de alfalfa (parte aérea y raíz) expresado en g x 100 g de peso seco y el total absorbido por la planta, se indica en el diagrama de barras de la figura 22. De forma semejante se exponen en la figura 23 los datos referentes al contenido de azufre en forma de sulfatos. Los dos diagramas son resultado de 8 tablas del "addendum", las comprendidas entre la LXXIX y la LXXXVI. Además se incluyen a continuación cuatro tablas más en las que se recogen el contenido de azufre orgánico en parte aérea y en raíz, expresado en % y en mg.planta⁻¹ (total absorbido por la planta).

El contenido de azufre total y de sulfatos en la planta incrementa al aumentar el nivel de sulfatos en el medio, de forma altamente significativa ($P = 0,001$). Se podría deducir que la absorción de los sulfatos está limitada por el nivel de azufre en el medio radical. Es de destacar el bajo nivel de azufre total que presenta el testigo teniendo en cuenta que posee un nivel de sulfatos en el medio que se situaría por encima del tratamiento 4.

En las tablas 29 y 30 se exponen la relación N/S en parte aérea y raíz de alfalfa respectivamente. Se puede observar que el tratamiento 1 presenta un valor más elevado - tanto en parte aérea como en raíz y a partir de aquí disminuye con la relación N/S en el medio.

Los resultados correspondientes al contenido de P, K, Ca y Mg determinados en parte aérea y raíz de las plantas se exponen en las figuras 24 y 25 expresados en % materia seca y el total de elemento absorbido por la planta respectivamente. Cada una es resumen de 8 tablas que se recogen en el "addendum" final (XCI- XCVIII y XCIX-CVI respectivamente). Los altos niveles de nitrógeno favorecen el contenido de magnesio y calcio en parte aérea y raíz y también incrementa el potasio en raíz, mientras que los sulfatos - del medio aumentan el contenido de potasio en raíz y de fósforo en toda la planta.

Nitrógeno y Nitratos.

El nitrógeno en la planta se acumula más en la parte aérea que en la raíz (Schrader, 1978), aunque una pequeña parte puede quedar acumulado como nitratos (figura 21). Hay que tener en cuenta que en alfalfa los nitratos se reducen en las hojas. La capacidad que tienen las raíces de reducir nitratos varía con la especie vegetal.

En raíces de alfalfa, se observa una correlación positiva entre niveles de nitrato reductasa (figura 19) con el nivel de nitrógeno orgánico y negativa con el contenido de nitratos. Por el contrario no existe correlación entre actividad nitrato reductasa de la parte aérea (figura 19) y el contenido de nitrógeno orgánico o en forma de nitratos (figura 20 y 21 respectivamente). La acumulación de nitrógeno orgánico en la parte aérea de alfalfa sometida a los distintos tratamientos, parece que está correlacionada con la

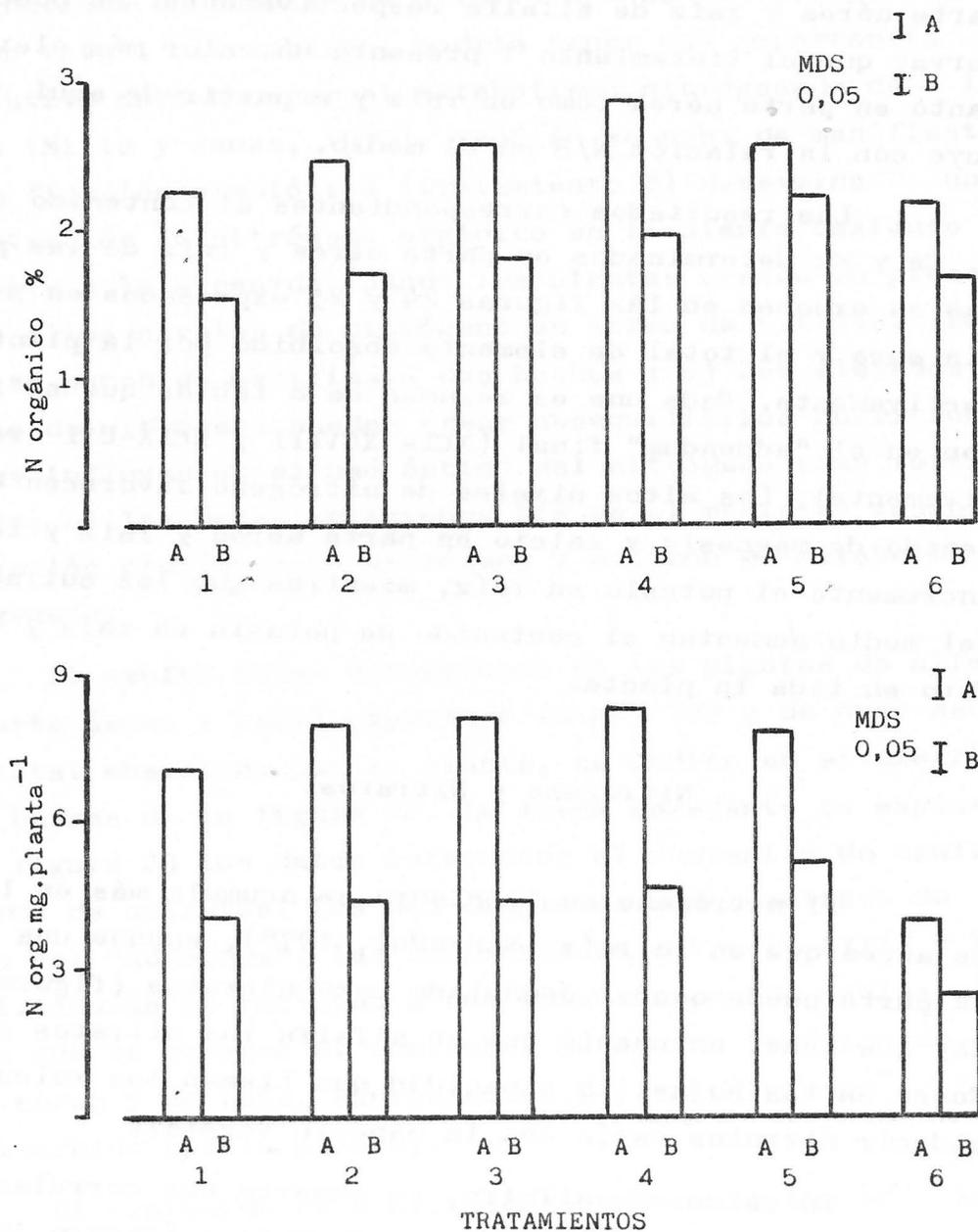


Fig. 20.- Contenido de nitrógeno en % de peso seco (Diagrama superior) y en mg.planta⁻¹ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa, para cada tratamiento realizado. Parte aérea (A); Raíz (B). Experimentos tipo A.

disponibilidad de carbohidratos en la parte aérea (tabla 28), comprobándose que el nivel de carbohidratos puede condicionar la acumulación de nitrógeno en la planta, tanto procedente del nitrógeno combinado (Radin et al., 1978) como de la fijación simbiótica (Rabie, 1981).

A medida que la relación N/S en el medio de cultivo disminuye, el contenido de nitrógeno aumenta, poniéndose de manifiesto que la fijación de nitrógeno atmosférico por Rhizobium es más eficaz en aquellos tratamientos con una relación N/S baja. La competencia entre los dos sistemas de suministrar nitrógeno a la planta, descrita por numerosos autores (Oghoghorie y Pate, 1971; Dart, 1974; Rabie et al., 1980), no se evidencia en estos resultados, ya que los tratamientos con mejores cotas de nitrógeno orgánico frente al testigo son el 3, 4 y 5. Ello indica que la fijación de nitrógeno atmosférico se potencia con niveles medios y bajos de nitratos en el medio radical (Haque et al., 1980).

La acumulación de nitratos en parte aérea y raíz de alfalfa es evidente en los tratamientos con una relación N/S alta (tratamiento 1), se puede hablar de un consumo de lujo, es decir, de una absorción de nitrógeno no relacionada con un aumento del rendimiento (Blanc y Morisot, 1980), o de una falta del sistema enzimático que lleve a cabo su asimilación. Hecho poco probable ya que la nitrato reductasa es un enzima inducible por su sustrato (Aslam et al., 1976). Sin embargo es bastante asumible, a tenor de los datos obtenidos, que las plantas de los tratamientos 1 y 2 reducen menos eficientemente los nitratos que las sometidas a otros tratamientos.

Los nitratos se acumulan de distinta forma en el vegetal (Cantliffe, 1972). En las plantas de alfalfa la acumulación es, como en la mayoría de las leguminosas, algo mayor en raíces como resultado de una menor actividad nitrato reductasa (Barker y Maynard, 1972) como se vio en la figura 19.

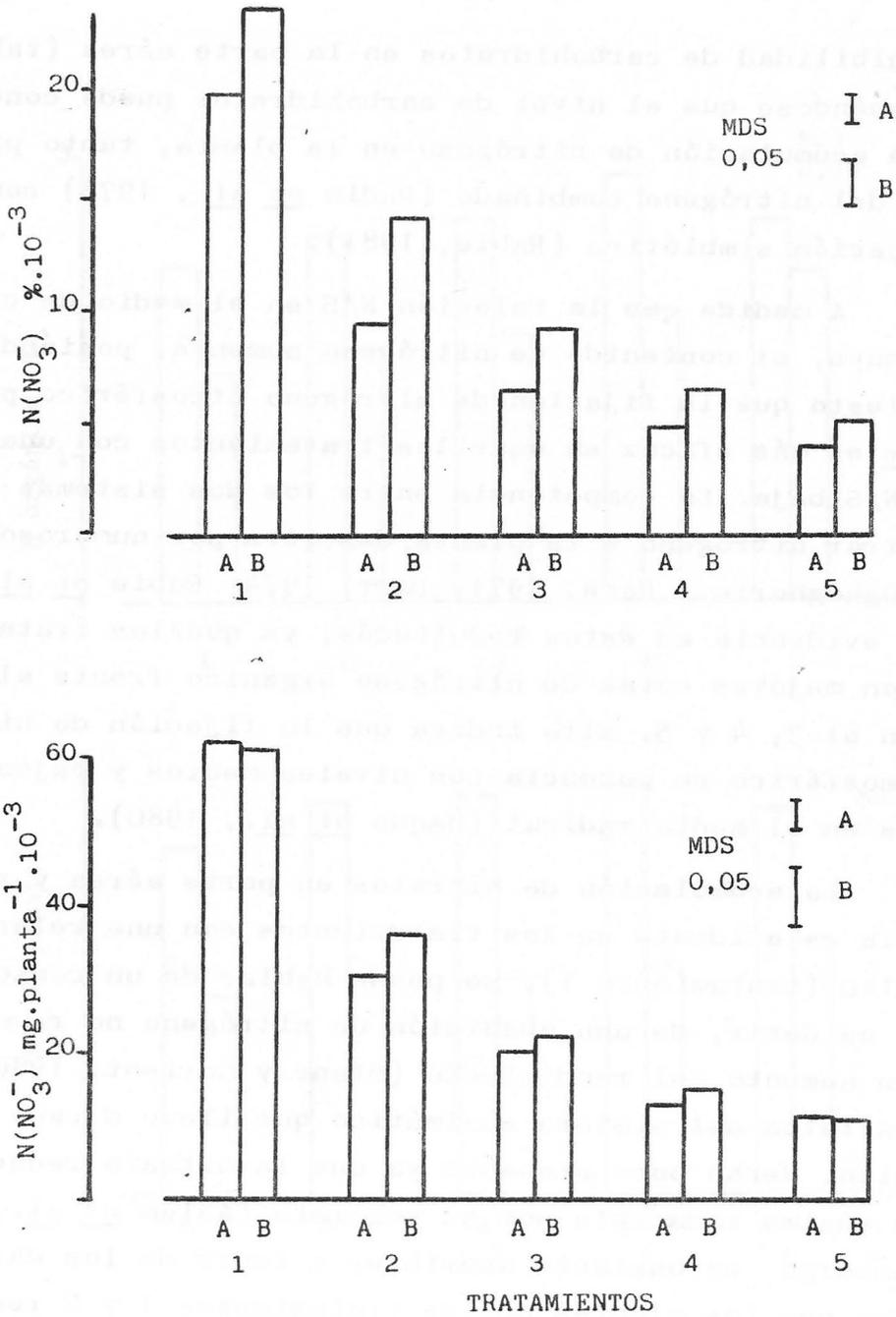


Fig. 21.- Contenido de nitrógeno en forma de nitrato, expresado en $\% \cdot 10^{-3}$ de peso seco (Diagrama superior) y en $\text{mg.planta}^{-1} \cdot 10^{-3}$ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa, para cada tratamiento realizado. Parte aérea (A); Raíz (B). Experimentos - tipo A.

La débil acumulación de nitratos observada en los tratamientos donde la fijación de nitrógeno atmosférico por Rhizobium ha sido eficaz, está de acuerdo con el efecto puesto de manifiesto en trabajos anteriores de este equipo (Lluch et al., 1983; Lluch et al., 1984). En este estudio también se pone de manifiesto que el nitrógeno, en forma de nitrato (figura 21), se acumula cuando el suministro de azufre no es adecuado (Stewart y Porter, 1969).

Azufre y Sulfatos.

El contenido de azufre en la planta aumenta con la disminución de la relación N/S en la solución mineral, como era de esperar. El contenido de azufre en la parte aérea es mayor que en raíz (figura 22). Los sulfatos son absorbidos por la raíz y transportados a las hojas donde son asimilados (Schwenn y Trebst, 1976), estando limitada por su movilidad, su redistribución a otros órganos (Mengel y Kirkby, 1982). Una característica de las leguminosas crecidas en medios con altos niveles de azufre es su acumulación en hojas viejas (Epstein, 1972), efecto observado en estos resultados.

La acumulación de azufre en forma de sulfato en la parte aérea de las plantas de alfalfa (Sheard, 1980) y en otros vegetales (Rehm y Caldwell, 1970) se ha descrito no estar influenciada por los niveles de nitrato en el medio de cultivo, ni por la forma de nitrógeno aplicado, pero sí está influenciada, esta acumulación, por el nivel de sulfato en el medio (Sheard et al., 1978).

Los valores que se exponen en la figura 23 referentes a los sulfatos contenidos en la raíz, demuestran que ésta puede actuar como órgano de reserva (Blanc y Morisot, 1980). Las plantas sometidas al tratamiento 1 pueden no tener cubiertas sus necesidades de azufre para la síntesis -

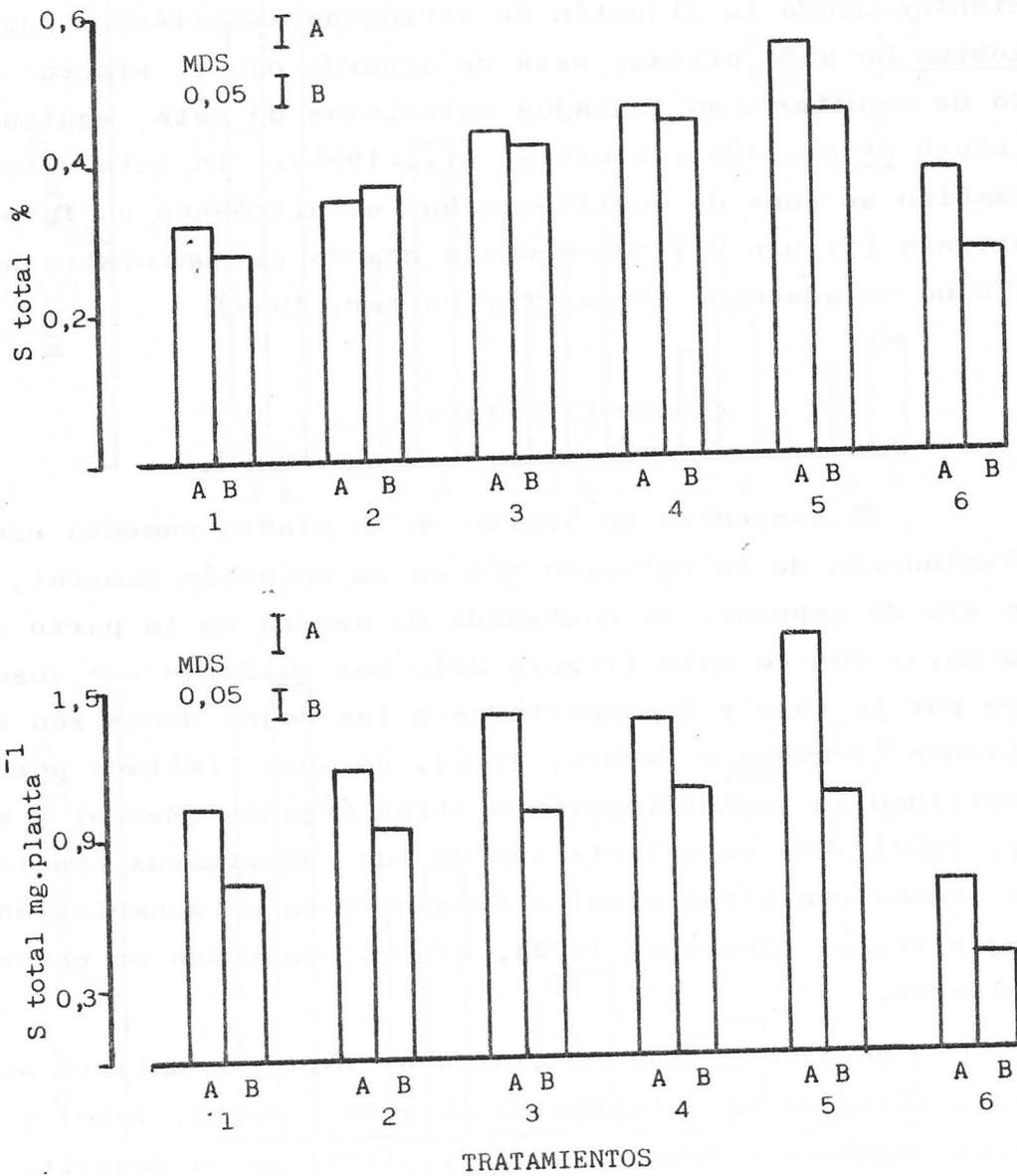


Fig. 22.- Contenido en azufre total, expresado en % de peso seco (Diagrama superior) y en mg.planta⁻¹ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Parte aérea (A); Raíz (B). Experimentos tipo A.

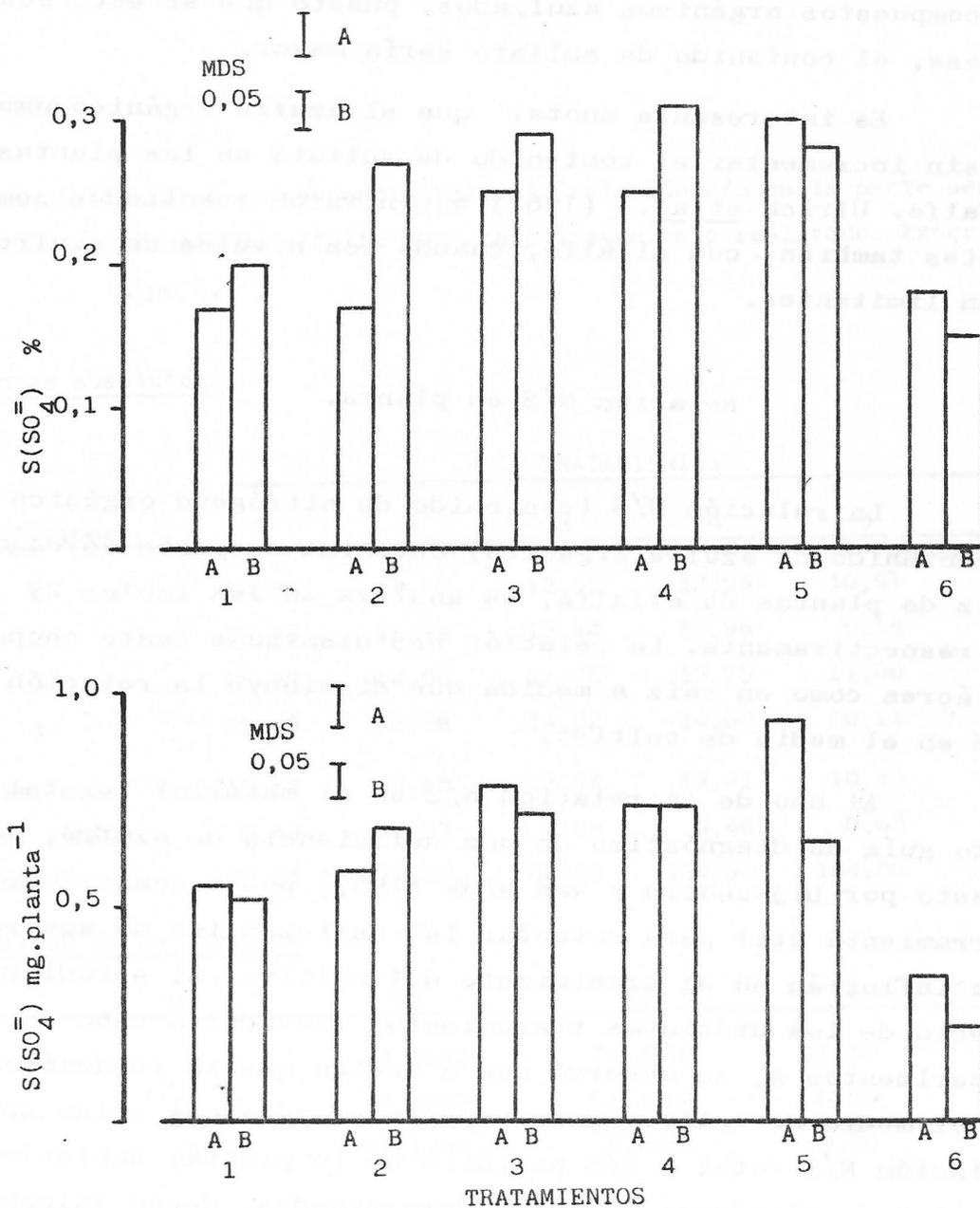


Fig. 23.- Contenido de azufre en forma de sulfato expresado en % de peso seco (Diagrama superior) y en $mg.planta^{-1}$ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa, para cada tratamiento ensayado. Parte aérea (A); Raíz (B). Experimentos tipo A.

de compuestos orgánicos azufrados, puesto que si esto ocurriese, el contenido de sulfato sería mayor.

Es interesante anotar que el azufre orgánico aumenta sin incrementar el contenido de sulfato en las plantas de alfalfa. Ulrich et al. (1967) encontraron resultados semejantes también, con alfalfa, cuando los niveles de azufre eran limitantes.

Relación N/S en planta.

La relación N/S (contenido de nitrógeno orgánico / contenido de azufre orgánico) obtenida en parte aérea y en raíz de plantas de alfalfa, se analiza en las tablas 29 y 30 respectivamente. La relación N/S disminuye tanto en parte aérea como en raíz a medida que disminuye la relación N/S en el medio de cultivo.

El uso de la relación N/S en el material vegetal, como guía de diagnóstico de una deficiencia de azufre, propuesto por Dijkshoorn y Van Wijk (1967) puede constituir una herramienta útil para detectar las deficiencias de azufre que influirán en el crecimiento del cultivo. Al estudiar el efecto de los distintos tratamientos llevados a cabo en los experimentos A, se observó que a medida que la relación N/S en el medio de cultivo disminuye se provoca una caída en la relación N/S total y N/S protéica de la planta; debido a los niveles de nitrógeno y azufre determinados. Según Aulakh et al. (1976), para asegurar la máxima cosecha en alfalfa, se necesita que por cada parte de azufre existan entre 11 y 12 partes de nitrógeno, valores semejantes a los observados en este trabajo (tabla 29). Sin embargo, la relación N/S en alfalfa, varía mucho con la literatura consultada (Pumphrey y Moore, 1965; Caldwell, et al., 1969; Spencer et al., 1978); a ello contribuirá, sin lugar a duda, la edad del cultivo, el nivel de otros nutrientes o la parte de la planta analizada (Lluch et al., 1983).

Tabla 29.- Valores correspondientes a la relación N/S en la parte aérea de - plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo A.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	14,95	11,80	12,52	12,95	10,91	11,54
2	15,78	15,98	13,14	12,95	9,58	9,94
3	16,28	14,05	14,76	13,75	11,00	9,45
4	15,13	12,38	14,32	14,00	10,11	12,44
Media	15,53	13,65	13,74	13,41	10,39	10,94
Desv. típica	0,59	1,53	0,98	0,46	0,60	1,26
% testigo	156,74	137,32	148,83	134,90	104,80	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	74,2592	14,3518	11,63	0,001
Error	18	22,8757	1,2708	0,00	
Total	23	97,1350	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	0,05	0,01	0,001
Tratamientos	1,674	2,287	3,124



Tabla 30.- Valores correspondientes a la relación N/S en raíz de plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo A.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	23,71	16,39	15,81	17,27	14,18	12,58
2	19,12	19,88	15,81	17,27	13,81	10,92
3	20,28	10,30	16,87	16,58	10,75	12,82
4	21,85	19,55	18,14	15,53	11,05	13,72
Media	21,99	17,41	16,66	16,66	12,41	12,51
Desv. típica	1,79	2,17	0,95	0,70	1,55	0,51
% testigo	162,72	128,87	123,30	123,30	92,10	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	300,5149	60,1029	20,02	0,001
Error	18	54,0311	3,0017	0,00	
Total	23	354,5460	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos	2,572	3,516	4,802

Otros macronutrientes : Fósforo, Potasio, Magnesio y Calcio.

Al estudiar el contenido de distintos macronutrientes en la parte aérea y raíz de alfalfa (figura 24 y 25) hay que tener en cuenta que la capacidad de cualquier planta para obtener suficiente cantidad de un elemento nutritivo depende de numerosos factores. Se ha establecido que la presencia de cualquier ion en el medio afecta al valor de absorción de la mayor parte de los otros iones, pudiendo actuar estimulando o deprimiendo dicha absorción. Estas interacciones pueden manifestarse a través del crecimiento de la planta a nivel de la absorción o transporte, o bien esencialmente a nivel metabólico.

El FOSFORO absorbido por la planta refleja el antagonismo N-P altamente significativo descrito por diversos autores (Ligero y Lluch, 1982; Ligero et al., 1981 b). Cadwell et al. (1969) atribuyeron el efecto del nitrógeno en el medio radical, sobre la absorción de fósforo por la planta, a una interacción química entre el N-P más que a un efecto fisiológico del nitrógeno en la planta. La disminución del contenido de fósforo en alfalfa está de acuerdo con Coic et al. (1962), cuando encuentran que los niveles bajos de nitrógeno en el medio afectan positivamente la absorción de fósforo. La relación S/P en planta de alfalfa es distinta para todos los tratamientos ensayados de los experimentos A. En general, esta relación es algo superior a 1 para la mayoría de los cultivos agrícolas excepto cereales. Radet (1966) informa de una relación de 1.26 a 1.66 para la alfalfa y Cadwell et al. (1969) de 0.45 a 1.42 según que la alfalfa se cultive en condiciones de deficiencia o exceso de azufre. Estos últimos datos están en línea con los resultados obtenidos para la relación S/P en esta memoria.

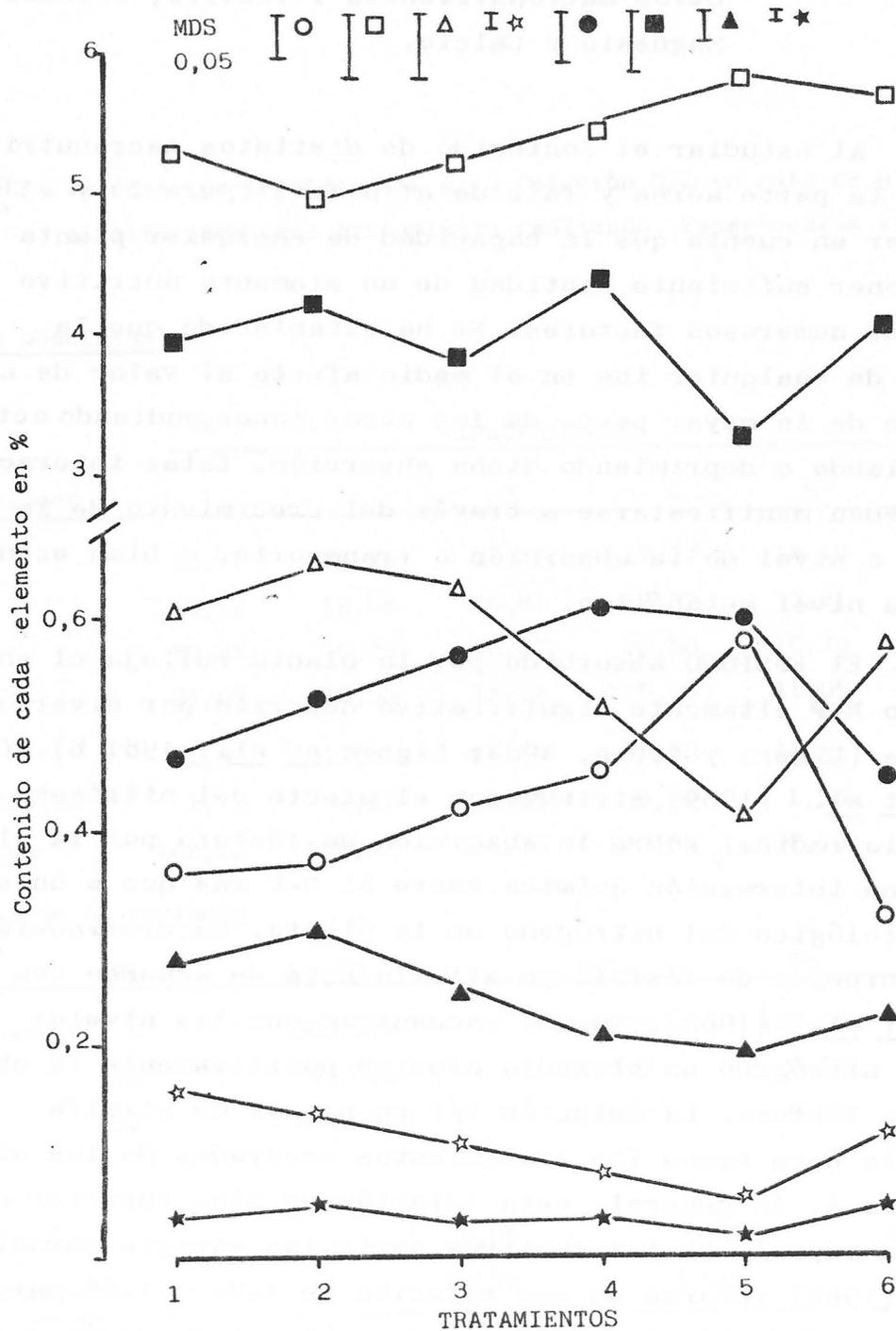


Fig. 24.- Contenido de P(○), K (□), Ca(Δ) y Mg (☆), en parte aérea (símbolos en blanco) y en raíz (símbolos en negro) de plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo A.

El POTASIO es un elemento nutritivo importante para optimizar los parámetros asociados con la fijación del nitrógeno, tales como nódulos por planta, actividad nitrogenosa, etc., que van a contribuir al mayor crecimiento de la planta (Gómez et al., 1983). El nivel de potasio absorbido por la planta incrementa a medida que disminuye la relación N/S en el medio de cultivo, como era de esperar según los trabajos anteriormente mencionados. La interacción negativa entre K-Ca indica que la absorción de potasio, disminuye la tendencia a aumentar el contenido de calcio en el citoplasma (Lynd et al., 1980).

El contenido de CALCIO en la parte aérea y en la raíz está correlacionado positivamente con la relación N/S en el medio de cultivo. El calcio absorbido por la planta contribuye a mantener el balance anión-cación en la misma, favoreciendo al mismo tiempo la absorción de nitratos y no la de sulfatos como señalan Aulakh y Dev (1978). Existe un efecto sinérgico o favorable entre el calcio absorbido y el nitrógeno suministrado, no descrito en bibliografía. Otro efecto observado, descrito en judías (Phaseolus vulgaris), es el antagonismo entre P-Ca (Lluch et al., 1984). Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían interpretarse en virtud de la influencia de distintos cationes sobre el transporte, a través del xilema y floema, de los aniones inorgánicos previamente absorbidos ya que la movilidad de estos últimos depende del catión que actúa como acompañante.

El contenido de MAGNESIO en la parte aérea, en todos los tratamientos ensayados, va disminuyendo a medida que disminuye en la solución mineral la relación N/S. Los valores encontrados tienen una significación estadística muy alta ($P = 0,001$). Tanto en la parte aérea como en la raíz, se advierte un sinérgismo N-Mg y un antagonismo S-Mg, efecto distinto al descrito en P. vulgaris (Lluch et al., 1984). El contenido de magnesio en parte aérea y raíz, no indica que es

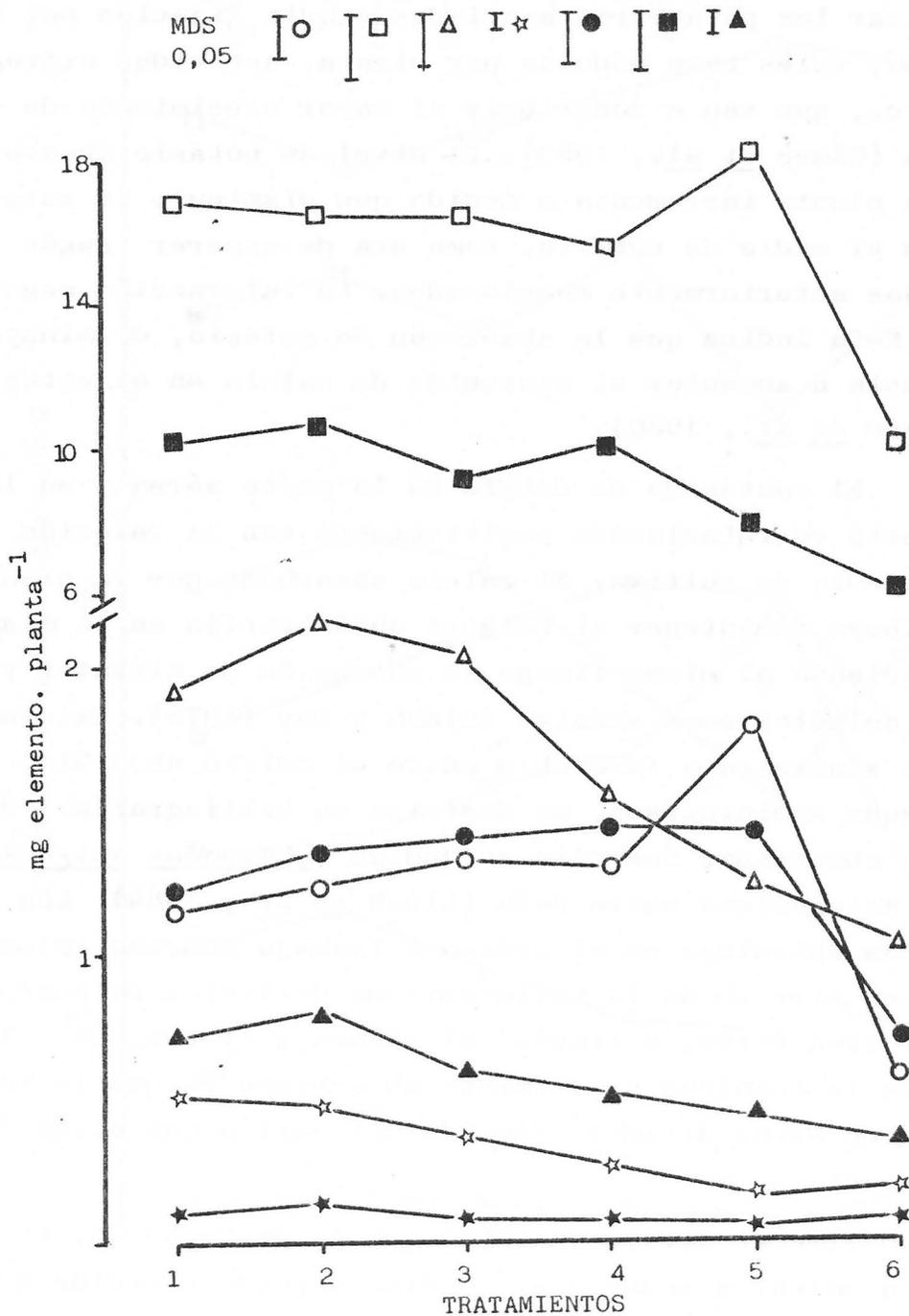


Fig. 25.- Contenido de P(○), K(□),Ca(Δ), y Mg(☆), en parte aérea (símbolos en blanco) y en raíz (símbolos en negro) de plantas de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo A.

te elemento compita en su absorción con algún otro de los elementos estudiados, puesto que presenta una tendencia se mejante al calcio absorbido por las plantas.

La interacción N-S en el medio radical va a condicionar una alteración del metabolismo de la planta. Cuando la relación N/S es baja, se ha puesto de manifiesto que se mejora la nutrición nitrogenada, la azufrada y la efectividad de la simbiosis Rhizobium-leguminosa se acentúa favorablemente. Estos aspectos observados en el estudio de los distintos parámetros bioquímicos, fisiológicos o analíticos de terminados, indican que una adecuada relación N/S es muy interésante para los cultivos de leguminosas forrajeras.

En este trabajo no se ha detectado un efecto espectacular de los tratamientos sobre la cosecha. En cambio, el incremento respecto al testigo es apreciable lo que indica, que la fijación biológica no proporciona el nitrógeno suficiente y puede ser conveniente suministrar a las plantas inoculadas una fertilización equilibrada. Es de destacar desde el punto de vista económico, que plantas con un aporte mínimo de nitrógeno combinado alcancen un crecimiento que no difiera, significativamente, del alcanzado por las plantas que han recibido un elevado aporte de este nutriente.

Como posible causa que puede mitigar las diferencias debidas a tratamientos, en cuanto a crecimiento de la planta, se podría apuntar las restringidas condiciones de crecimiento impuestas por el propio sistema de cultivo. Otro aspecto interesante que se puede deducir de los resultados comentados es sobre la calidad de la cosecha, que debe aumentar al disminuir la relación N/S en el medio, puesto que las plantas incrementan su contenido en nitrógeno y azufre orgánico.

Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos corroboran los de Martel y Zizka (1977) y Olivares et al. (1983) que señalan el efecto beneficioso de la adición de estos dos elementos a la alfalfa y haba respectivamente.

Sin embargo, en este estudio se profundiza sobre los niveles óptimos a emplear, detectándose, que es conveniente su administrar a las plantas inoculadas con R. meliloti una fertilización suplementaria.

2.2.- Experimentos Tipo B.

Siguiendo con el plan de trabajo expuesto en el capítulo de Material y Métodos se procedió a continuación a estudiar el crecimiento de plantas de alfalfa sometidas a dosis crecientes de sulfatos en el medio, manteniendo en la solución nutritiva un nivel de nitrógeno, en forma de nitratos, constante. La concentración de este elemento es la correspondiente al nivel mínimo utilizado en los experimentos A.

Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos se recopilan en 8 tablas y 9 figuras.

2.2.1.- Análisis de Crecimiento.

En la tabla 31 se expone el número de hojas trifoliadas por planta de alfalfa, encontrándose que todos los tratamientos alcanzan valores superiores al testigo, con diferencias estadísticas altamente significativas ($P= 0,001$). En el tratamiento 4 se obtiene el máximo número de hojas y también el valor más alto de longitud de tallo/planta, resultado que se expone en la tabla 32. Tanto el número de hojas como la longitud del tallo son dos parámetros de crecimiento vegetativo influenciados por el azufre (Zaroug y Munns, 1979; Lluch et al., 1984), sin embargo, no se refleja en la cosecha obtenida, cuyo máximo se alcanza en tratamientos distintos.

Los resultados correspondientes al peso fresco de los distintos órganos de las plantas de alfalfa se indican en la tabla 33, resumen de otras 4 recopiladas en el "adendum" (tablas CXIII a la CXVI). En general, se observa una respuesta positiva en todos los tratamientos ensayados frente al testigo, aunque sin marcadas diferencias entre -

Tabla 31.- Resultados relativos al número de hojas trifoliadas por planta de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo B.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	43,00	43,50	44,25	47,62	38,12	33,75
2	41,50	39,62	40,50	44,62	44,75	29,12
3	39,25	43,75	42,62	43,12	43,00	31,00
4	39,50	38,00	41,37	42,12	35,00	29,87
Media	40,81	41,21	42,18	44,37	40,21	30,93
Desv. típica	1,53	2,47	1,41	2,07	3,86	1,75
% testigo	131,91	133,53	136,36	143,43	130,00	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	432,7005	86,5401	11,85	0,001
Error	18	131,3515	7,2973	0,00	
Total	23	564,0520	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos	4,011	5,482	7,487

Tabla 32.- Resultados relativos a la longitud total de tallos por planta de alfalfa, en cm, para cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo B.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	69,12	67,25	70,12	76,75	67,50	64,20
2	62,87	69,50	70,50	79,87	66,75	62,75
3	70,25	71,00	70,12	65,50	65,87	65,25
4	62,75	67,87	65,12	65,87	70,25	57,25
Media	66,25	68,90	68,96	72,00	67,59	62,46
Desv. típica	3,46	1,46	2,22	6,40	1,63	3,15
% testigo	106,05	110,30	110,40	115,25	108,20	100,00

Análisis de la varianza

F.v	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	204,1380	40,8276	2,52	0,1
Error	18	291,0155	16,1675	0,00	
Total	23	495,1535	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad		<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos		5,970	8,159	11,145

Tabla 33.- Peso fresco de hoja, tallo, parte aérea y raíz, expresado en g, de plantas de alfalfa en cada tratamiento ensayado. experimentos tipo B.

TRATAMIENTOS		PESO FRESCO			
		Hoja	Tallo	Parte aérea	Raíz
1	\bar{X}	7,29	5,29	13,64	15,43
	%	132	135	135	146
2	\bar{X}	7,04	5,87	14,03	16,16
	%	128	149	139	152
3	\bar{X}	7,05	5,44	13,16	18,22
	%	127	138	130	172
4	\bar{X}	6,82	5,42	12,95	15,86
	%	123	138	128	150
5	\bar{X}	6,46	5,28	12,99	15,04
	%	117	134	128	142
6	\bar{X}	5,52	3,93	10,11	10,60
		100	100	100	100
Probabilidad		0,01	0,001	0,001	0,001
0,05		0,904	0,589	1,161	2,162
M.D.S.	0,01	1,235	0,805	1,587	2,955
	0,001	1,688	1,100	2,168	4,036

Tabla 34.- Resultados relativos a la relación peso seco de raíz / parte - aérea en plantas de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo B.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	0,90	0,93	1,04	0,89	1,05	0,81
2	0,95	1,00	0,89	1,00	0,98	0,85
3	0,96	0,85	1,22	1,09	1,09	0,75
4	0,94	1,16	1,06	1,11	1,00	0,90
Media	0,94	0,98	1,05	1,02	1,03	0,83
Desv. típica	0,02	0,11	0,11	0,08	0,04	0,05
% testigo	113	118	127	123	124	100

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	0,137	0,027	3,15	0,05
Error	18	0,156	0,008	0,00	
Total	23	0,293	0,000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad		<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos		0,138	0,189	0,258

ellos. Teniendo en cuenta que el nivel de nitrógeno combinado en los tratamientos de los experimentos B, es muy bajo, se puede pensar que si se alcanzan incrementos de materia fresca, de hasta cerca del 40 % respecto al testigo, debe ser porque éstos permiten el establecimiento de una simbiosis mucho más efectiva.

La figura 26 (tabla CXVII y las tres siguientes - del "addendum") representa los valores medios del peso seco de tallo, hoja, parte aérea y raíz de alfalfa determinados en los diferentes tratamientos realizados. Todos los tratamientos alcanzan un incremento sobre el testigo altamente significativo ($P = 0,001$), como se observó para el peso fresco. Sin embargo, no existen grandes diferencias entre los tratamientos, es decir, con el nivel de nitrógeno suministrado las plantas no responden a la adición de azufre. Por otro lado, se puede observar que el tratamiento 2 presenta un valor más elevado en el tallo y en la parte aérea de la planta, mientras que el máximo desarrollo radical se detecta en el tratamiento 3. Ello va a dar lugar a que la máxima relación peso seco de raíz/parte aérea se alcance en dicho tratamiento. Los valores de la relación peso seco de raíz/parte aérea se detallan en la tabla 34 junto con el análisis estadístico realizado.

La relación entre peso seco de raíz y parte aérea aumenta con el sulfato del medio, esto se podría asemejar a los resultados obtenidos con trébol, leguminosa forrajera con una relación raíz/parte aérea mayor cuando posee nódulos activos (Ryle *et al.*, 1981). Los resultados obtenidos parecen indicar que en las leguminosas noduladas una gran proporción de la fuente carbonada es utilizada en el crecimiento de las raíces y nódulos y por tanto, queda disponible menos carbono para el crecimiento del brote. La máxima relación raíz/parte aérea no se alcanza en el tratamiento con mayor número de nódulos y de peso seco de los mismos (Tratamiento 2, Fig. 27), sino en los que presentan la má-

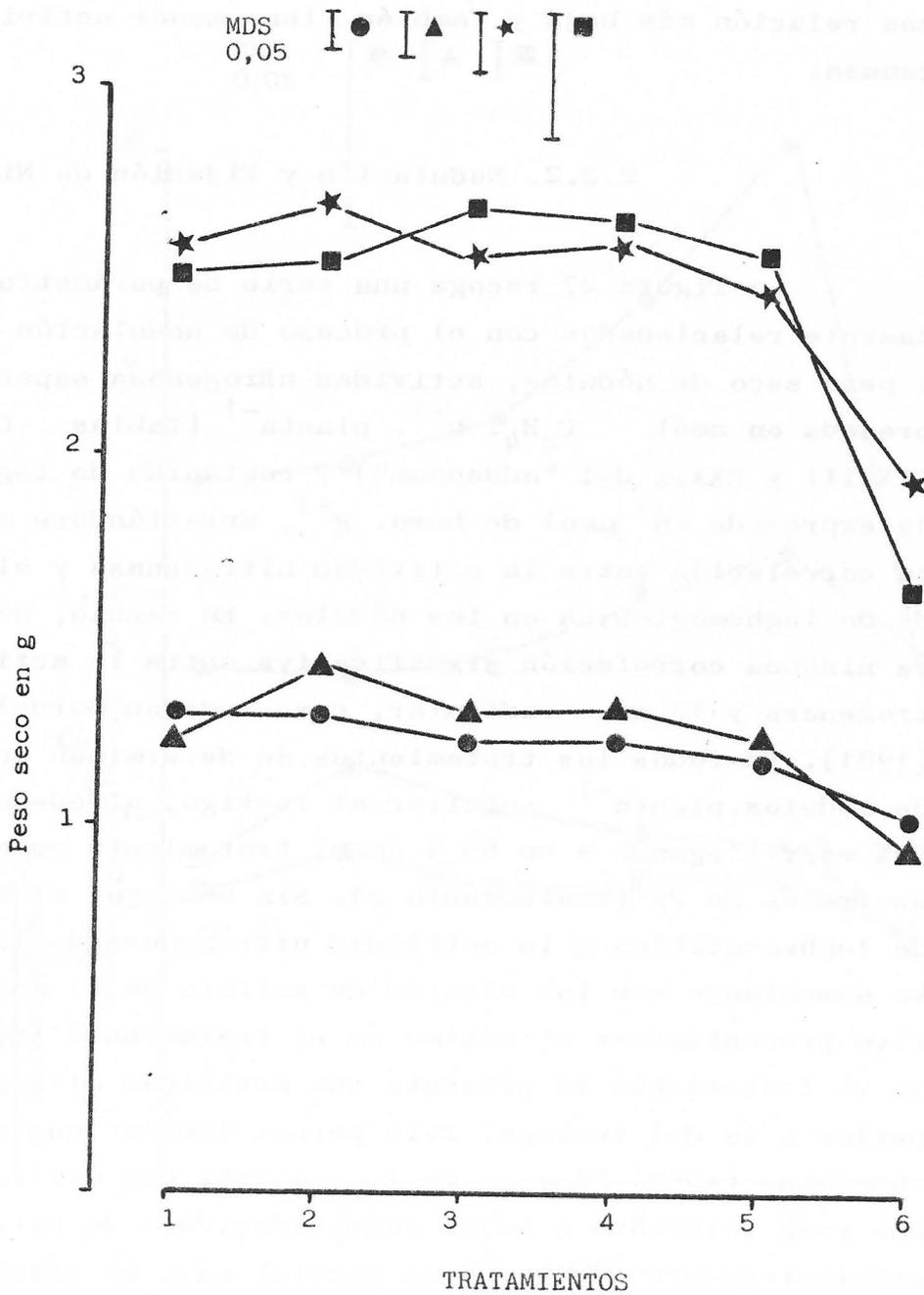


Fig. 26.- Peso seco medio de hoja (●), tallo (▲), raíz (■) y parte - aérea (★) en cada tratamiento realizado. Experimento tipo B.

xima actividad nitrogenasa específica. El testigo presenta una relación más baja y también tiene menor actividad nitrogenasa.

2.2.2. Nodulación y Fijación de Nitrógeno.

La figura 27 recoge una serie de parámetros perfectamente relacionados con el proceso de nodulación : Número y peso seco de nódulos, actividad nitrogenasa específica, expresada en $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{planta}^{-1}$ (tablas CXXVII, CXXVIII y CXXIX del "addendum") y contenido de leghemoglobina expresada en $\mu\text{mol de hemo. g}^{-1}$, apreciándose una perfecta correlación entre la actividad nitrogenasa y el contenido de leghemoglobina en los nódulos. En cambio, no se observa ninguna correlación significativa entre la actividad nitrogenasa y la masa radicular, como indican Bordeleau *et al.* (1981). En todos los tratamientos se determinan un número de nódulos.planta⁻¹ superior al testigo, alrededor de un 50% más, llegando a un 63 % en el tratamiento cuya dosis de azufre es de 2S (Tratamiento 2). Sin embargo, el contenido de leghemoglobina y la actividad nitrogenasa de los nódulos va aumentando con los niveles de sulfato en el medio de cultivo presentándose el máximo en el tratamiento 5S, aunque ya el tratamiento 1S presenta una actividad nitrogenasa superior a la del testigo. Ello parece indicar que de acuerdo con Evans (1982) la raza de *R. meliloti* GR4 utilizada, es una raza tolerante a bajas concentraciones de nitrógeno y simbióticamente efectiva. En general para el establecimiento de una simbiosis funcional, las razas de *Rhizobium* son tolerantes a 50 ppm de nitrógeno en forma de nitrato pero no a 200 ppm.

Un resultado que parece interesante comentar es la correlación existente entre actividad nitrogenasa y contenido de leghemoglobina en nódulos de alfalfa en los experimentos

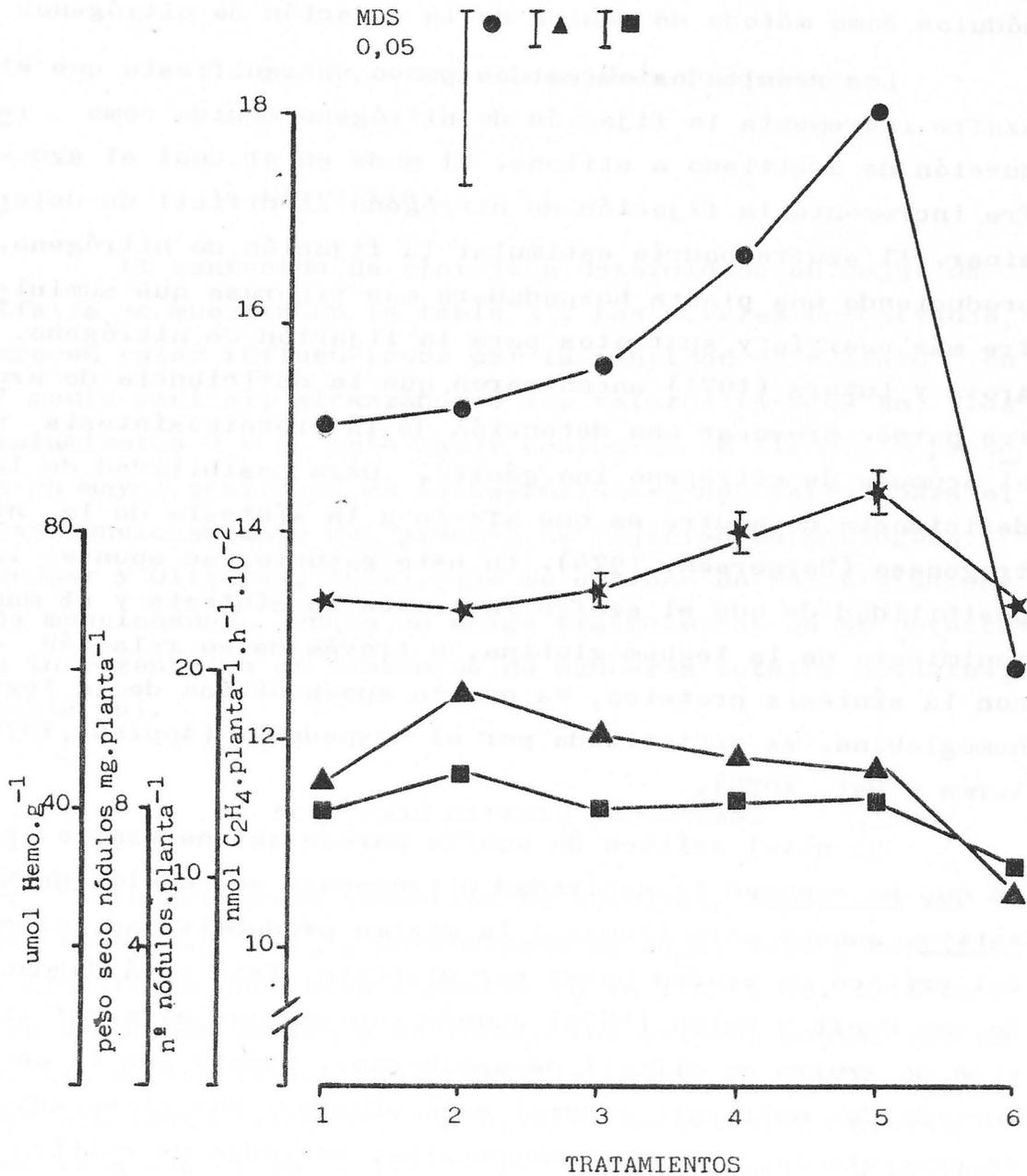


Fig. 27.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲), peso seco de nódulos (■) y contenido en leghemoglobina (★), para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo B.

tos B (figura 27) y A (figura 18), lo que podría llevar a la idea de utilizar el contenido de leghemoglobina de los nódulos como método de medida de la fijación de nitrógeno.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el azufre incrementa la fijación de nitrógeno medida como reducción de acetileno a etileno. El modo en el cual el azufre incrementa la fijación de nitrógeno es difícil de determinar. El azufre podría estimular la fijación de nitrógeno, produciendo una planta hospedadora más vigorosa que suministre más energía y sustratos para la fijación de nitrógeno. Arora y Luthra (1971) encontraron que la deficiencia de azufre parece provocar una detención de la proteínosíntesis y el acúmulo de nitrógeno inorgánico. Otra posibilidad de la deficiencia de azufre es que afecte a la síntesis de la nitrógenasa (Bergersen, 1974). En este estudio, se apunta la posibilidad de que el azufre favorezca la síntesis y el mantenimiento de la leghemoglobina, a través de su relación con la síntesis proteica, ya que la apo-proteína de la leghemoglobina, es sintetizada por el hospedador (Appleby, 1974; Verma y Bal, 1976).

Un nivel crítico de azufre parece ser necesario para que se exprese la actividad nitrogenasa en nódulos de M. sativa, aunque para llegar a la máxima productividad, el nivel crítico de azufre puede ser distinto. Esto está de acuerdo con Hoeft y Walsh (1975) cuando indican que el nivel crítico de azufre es difícil de establecer, puesto que la absorción del nutriente mineral está afectada por el estadio de crecimiento, factores ambientales, variedad de cultivo y órgano de la planta muestreado. Los valores críticos sugeridos para la alfalfa han sido diversos (Pumphrey y Moore, 1965; Sorensen et al., 1968; Caldwell et al., 1969).

Estos resultados sugieren, que un nivel adecuado de actividad nitrogenasa, detectado en los estadios iniciales de la inducción floral ('evocation') se logra en un rango de concentraciones de azufre comprendido entre 4 - 11 meq de

azufre. l^{-1} de solución, siempre que el nivel de nitrógeno en el medio sea tal que no inhiba la fijación de nitrógeno.

2.2.3.- Determinaciones Bioquímicas.

Clorofila.

El contenido de clorofila determinado en hojas de alfalfa se muestra en la tabla 35. Los niveles encontrados, parecen estar influenciados por la cantidad de sulfato en el medio radical, alcanzándose los valores máximos en los tratamientos 4 y 5. Este mayor contenido en clorofila provoca un mayor contenido de fotoasimilados, necesarios para el buen funcionamiento del proceso de fijación de nitrógeno (Bedmar y Olivares, 1982), que se obtiene en los tratamientos mencionados, aunque en estos tratamientos no se detecta un incremento en el contenido de azúcares totales solubles (tabla 36).

Actividad nitrato reductasa.

La actividad reductora de nitratos, expresada en $nmol$ de $NO_2^- \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$, determinada en hoja, raíz y nódulos de alfalfa se encuentra expuesta en la figura 28. Esta ha sido elaborada teniendo en cuenta los valores medios que se exponen en las tablas CXXX, CXXXI y CXXXII del "addendum". Como era lógico esperar, los niveles de actividad nitrato reductasa detectada en este tipo de experimentos es bastante inferior a la detectada en experimentos tipo A o C, ya vistos o que se verán después. Este hecho es aplicable a cualquiera de los órganos vegetales estudiados. No hay que olvidar que el nivel de nitratos en el medio, constante en todos los tratamientos, es un nivel muy por debajo del utilizado en las soluciones nutritivas standard.

Tabla 35.- Contenido de clorofila en hojas de alfalfa, expresado en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo B.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	3,43	3,51	3,59	3,85	3,93	3,55
2	3,33	3,43	3,65	3,74	4,09	3,40
3	3,45	3,50	3,64	3,94	3,99	3,44
4	3,48	3,59	3,46	3,81	3,87	3,49
5						
Media	3,42	3,50	3,58	3,83	3,97	3,47
Desv. típica	0,05	0,05	0,07	0,07	0,08	0,05
% testigo	98,63	101,08	104,66	110,51	114,40	100,00

Análisis de la varianza

Fv	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	1,3851	0,2770	46,02	0,001
<i>Repeticiones</i> Error	18	0,1083	0,0060	0,00	
Total	23	1,4935	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad		<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos		0,115	0,157	0,215

La máxima actividad nitrato reductasa en hojas, se obtiene en el tratamiento 2, contribuyendo sin duda al desarrollo de la parte aérea de la planta (figura 26). Se puede observar que determinados niveles de sulfatos contribuyen a estimular la actividad nitrato reductasa, mientras el nivel de nitrato es el mismo en todos los tratamientos. El azufre es un elemento muy relacionado con el metabolismo del nitrógeno (Arora y Luthra, 1971; Ligeró y Lluçh, 1982). Las plantas con deficiencias de azufre tienen una actividad nitrato reductasa inferior a las normales (Eckerson, 1967). Resultados semejantes se obtienen en este trabajo, aunque de nuevo se podría hablar de un nivel crítico de azufre, propugnado anteriormente, para activar la nitrato reductasa. Friedrich et al. (1977) indican que la actividad nitrato reductasa no se afecta por la fertilización azufrada cuando la concentración de azufre en los tejidos vegetales está por encima del nivel crítico.

La baja actividad nitrato reductasa en hojas condiciona una posible incapacidad de la proteínosíntesis en las plantas, debido a la carencia de aminoácidos azufrados (Triboi-Blondel, 1979). También afecta negativamente la síntesis proteica en las plantas con niveles de azufre bajos, según Anderson y Spencer (1950), la escasa nodulación y la fijación simbiótica del nitrógeno que se consigue en estas plantas. Datos semejantes se obtienen en este trabajo. Se observa en las figuras 27 y 28 que la máxima nodulación (número y peso seco de nódulos) se alcanza con el tratamiento 2, en el que también se obtiene la máxima actividad nitrato reductasa en hoja.

La actividad nitrato reductasa en nódulos coincide con la tendencia que sigue la actividad nitrogenasa de los mismos. El sulfato, no sólo estimula la actividad nitrato reductasa en hojas, sino también en nódulos, presentándose aquí también el nivel crítico de azufre en el tratamiento 4 y 5. El sulfato del medio favorece la activación de la ni -

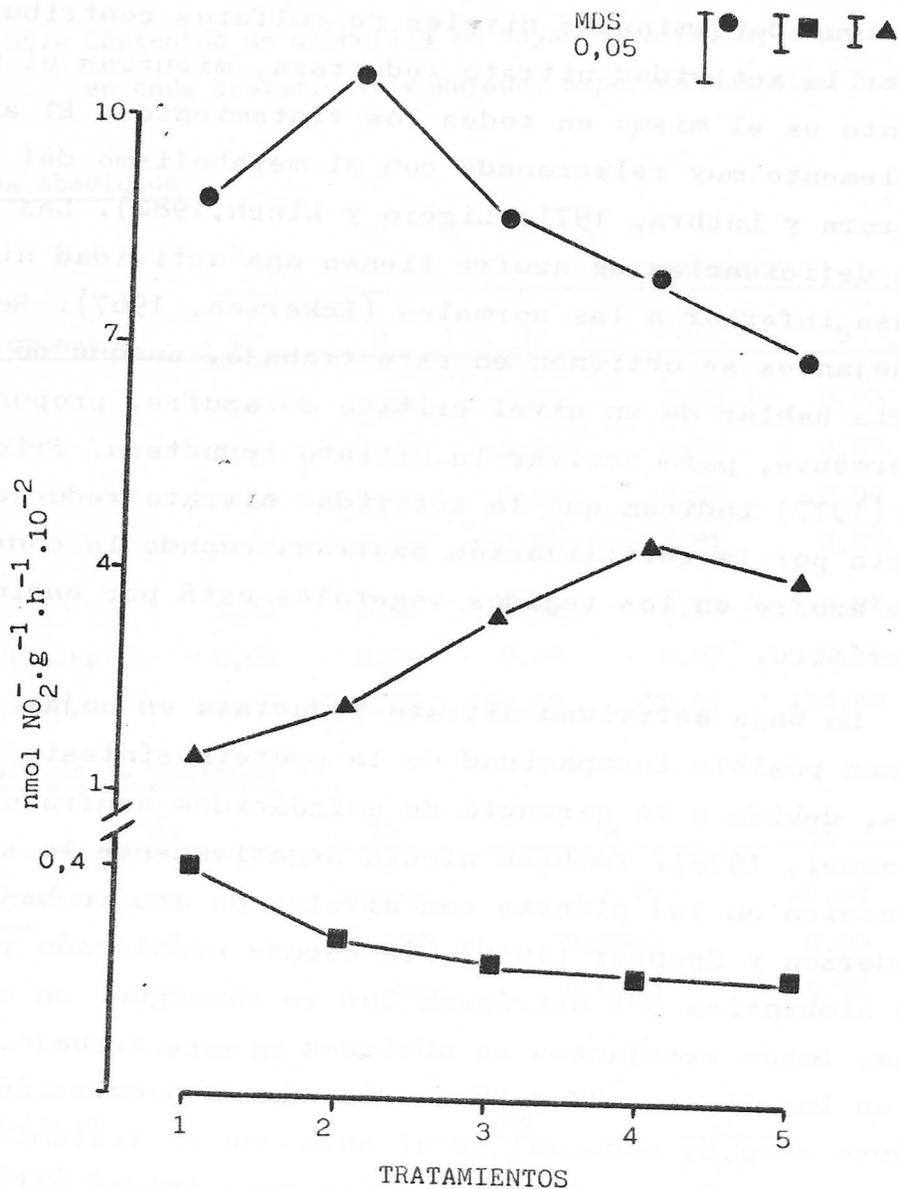


Fig. 28.- Actividad nitrato-reductasa detectada en hoja (●), raíces (■) y nódulos (▲), de plantas de alfalfa sometidas a los distintos tratamientos. Experimentos tipo B.

trato reductasa en el nódulo, lo que implica la producción de nitritos en el citoplasma de las células hospedadoras. Los nitritos procedentes de la reducción de nitratos en los bacteroides, han sido considerados como los responsables de la inhibición de la fijación de nitrógeno (Rigaud et al., 1973; Kennedy et al., 1975). Sin embargo, los resultados que se presentan en este tipo de experimentos, así como los anteriormente mencionados, confirman los datos de Gibson y Pagan (1977) y Manhart y Wong (1980), los cuales indican que el producto formado por la nitrato reductasa no afecta a la fijación de nitrógeno atmosférico.

En unos experimentos (A) como en otros (B) se observa que puede existir una relación inversa en la actividad nitrato reductasa de hojas y nódulos. El tratamiento que presenta la máxima actividad enzimática en hojas, presenta la mínima en nódulos, efecto no descrito en la bibliografía consultada. Este tipo de variaciones de la actividad nitrato reductasa ha sido descrita en la bibliografía entre hojas y raíces, dependiendo de distintos factores y según la especie vegetal (Aslam y Oaks, 1975; Robin et al., 1979).

?) El proceso de reducción de nitratos en las raíces de alfalfa no parece de gran intensidad, por lo que resulta de los valores de $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ obtenidos en los experimentos B (figura 28) y en los experimentos anteriormente estudiados (figura 19). La actividad nitrato reductasa en alfalfa es más importante en hojas que en raíces, algo semejante ocurre en maíz (Robin et al., 1979). En alfalfa no representa ni el 10 % de la nitrato reductasa en hoja, por término medio, valor semejante al obtenido por diferentes autores en otras plantas (Jones y Sheard, 1977).

Azúcares totales solubles y reductores.

A continuación van a ser comentados los resultados que se muestran en la tabla 36 (tablas CXXI - CXXVI del -

Tabla 36.- Contenido de azúcares totales solubles y reductores, expresado en mg.g^{-1} de hoja, tallo y raíz de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo B.

TRATAMIENTOS		AZUCARES TOTALES SOLUBLES			AZUCARES REDUCTORES		
		Hoja	Tallo	Raíz	Hoja	Tallo	Raíz
1	\bar{X}	7,69	7,20	4,97	2,72	2,58	0,95
	%	92	105	84	85	98	46
2	\bar{X}	7,72	7,26	5,89	3,07	2,83	1,08
	%	92	105	99	86	108	52
3	\bar{X}	8,59	7,41	5,26	3,11	2,82	1,37
	%	103	108	88	97	107	66
4	\bar{X}	7,87	7,47	5,36	2,95	2,75	1,49
	%	94	108	91	92	104	72
5	\bar{X}	7,87	7,84	5,72	3,22	3,07	2,15
	%	49	114	96	100	117	104
6	\bar{X}	8,37	6,88	5,94	3,21	2,62	2,07
		100	100	100	100	100	100
Probabilidad		—	0,01	0,01	0,1	—	0,001
0,05		—	0,419	0,982	0,342	—	0,207
M.D.S. 0,01		—	0,573	1,342	0,467	—	0,283
0,001		—	0,783	1,833	0,638	—	0,387

"addendum") en ella se indica el contenido de azúcares totales solubles y reductores, expresados en mg equivalentes de glucosa. g^{-1} , en hoja, tallo y raíz.

El nivel de azúcares totales solubles en hoja no parece estar influenciado por el sulfato adicionado al medio. Hay un pequeño aumento del contenido de azúcares con el sulfato del medio hasta el nivel 3S, donde se alcanza el máximo y después disminuye. Sin embargo, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

En el tallo, los azúcares totales aumentan al hacer lo los sulfatos en la solución de cultivo. El tratamiento 5S presenta el contenido más elevado de azúcares totales con diferencias significativas ($P = 0,001$) frente a los tratamientos 1,2 y testigo y algo menos significativas frente al 3 ($P = 0,05$). Estas diferencias pueden ser debidas a un efecto sobre la actividad fotoasimiladora, el tallo de las plantas de alfalfa es clorofílico y la máxima cantidad de clorofila (tabla 35) se obtiene con los niveles 4S y 5S. Sin embargo, como no se observó diferencia alguna en el nivel de azúcares totales solubles en hoja, se podría pensar que las diferencias observadas en el tallo podrían deberse al transporte de fotoasimilados a los nódulos (Lawrie y Wheeler, 1975). El nivel de azúcares totales determinado en raíz, es difícil de explicar, alcanzando en cualquiera de los tratamientos realizados, valores ligeramente inferiores al testigo.

Un aspecto interesante a destacar, observado ya en los experimentos comentados anteriormente, son los niveles tan semejantes de azúcares totales y reductores en hoja y tallos de cualquiera de los tratamientos ensayados.

El contenido de azúcares reductores en hojas responde al sulfato del medio radical de forma semejante a como lo hacen los azúcares totales. Niveles de azúcares inferiores al testigo van aumentando con el nivel de sulfatos, man

teniéndose bastante constante a partir de una determinada dosis de sulfato. El tratamiento 1S con niveles de azúcares reductores bajos es muy significativo frente al 5S ($P = 0,001$) y algo menos significativo ($P = 0,05$) respecto a los tratamientos 2S y 3S. Los niveles de azúcares reductores en tallos se comportan igual y no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Rending y McComb (1957) no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de azúcares reductores en tallos de alfalfa crecida con diversos niveles de sulfatos, pero en un estudio posterior (Rending y McComb, 1961), encontraron que el almacenamiento de azufre disminuye la concentración de azúcares, especialmente glucosa, en los tallos.

Parece que el contenido de azúcares reductores en raíz está influenciado por el nivel de azufre, en forma de sulfato, en el medio. El tratamiento 5S tiene el nivel de azúcares reductores más elevado y con diferencias altamente significativas ($P = 0,001$) respecto a los demás tratamientos. Estos niveles elevados de azúcares en la raíz, están correlacionados con la máxima actividad nitrogenasa, sin embargo no se relaciona con el máximo desarrollo radical o el máximo desarrollo nodular, como cabría esperar. Wilson *et al.* (1933), proponen que la relación C/N endógena gobierna la formación de nódulos y la adición de azúcares incrementa esta relación, mejorándose así la nodulación (Wong, 1980).

2.2.4.- Análisis Químico de la Planta.

El análisis químico de la planta se ha estudiado en la parte aérea y raíz de alfalfa. La figura 29 (tablas CXXXIII - CXXXVI del "addendum") representa en un diagrama de barras el contenido de nitrógeno, expresado en % de peso

seco y el total absorbido por la planta durante el cultivo. El contenido de nitrógeno en forma de nitratos, determinado en parte aérea y raíz de alfalfa, se expone en otro diagrama de barras en la figura 30 (tablas CXXXVII, CXXXVIII, CXXXIX y CXL del "addendum"). Además se han añadido dos tablas más CCLI y CXLII que indican el nitrógeno total absorbido por la planta (orgánico e inorgánico) en parte aérea y raíz de alfalfa respectivamente.

La forma de representar el contenido de azufre total y en forma de sulfatos es bastante semejante a la representación de nitrógeno y nitratos. Se indica en la figura 31 el contenido de azufre en % de peso seco y total absorbido por la planta en parte aérea y raíz y el contenido de azufre en forma de sulfato en la figura 32. Los dos diagramas anteriores son reflejo de 8 tablas del "addendum", las comprendidas entre la CXLIII y la CL, en las cuales se detallan los valores primarios de todas las repeticiones y el análisis estadístico realizado. También se incluye en las 4 tablas siguientes el contenido de azufre orgánico (azufre total menos el inorgánico) en parte aérea y raíz de alfalfa, y el contenido de azufre orgánico en la planta entera.

Un aspecto importante que se ha estudiado en todos los tipos de experimentos realizados ha sido la relación N/S obtenida en parte aérea y en raíz de las plantas de alfalfa. Se estudió la relación N orgánico/S orgánico, y N total/ S total, considerándose adecuado incluir en los resultados de esta Memoria los datos correspondientes a la relación N orgánico/S orgánico que son expuestos en las tablas 37 y 38, para la parte aérea y raíz respectivamente.

Otros elementos minerales esenciales determinados en las plantas de alfalfa han sido el fósforo, potasio, calcio y magnesio. En la figura 31 se representan dichos datos, expresados en % de elemento en materia seca, para la parte aérea y raíz (tablas CLV - CLXII del "addendum"). Y en la fi

gura 34 se representan en mg de elemento por planta, también para la parte aérea y raíz (tablas CLXIII - CLXX del "addendum").

Nitrógeno y Nitratos.

El nitrógeno se acumula principalmente en el brote y no en la raíz (figura 29). Como en el experimento anterior el azufre en el medio radical parece que contribuye a incrementar el nitrógeno en la planta, procedente de la fijación biológica, ya que el nivel de nitrógeno es mínimo y constante, alcanzándose el máximo con el tratamiento 4S. Este aumento de nitrógeno en parte aérea de las plantas de alfalfa, va a contribuir a incrementar la cosecha (figura 26).

La dosis mínima de azufre aplicada es la menos efectiva en el incremento del contenido de nitrógeno (Caldwell et al., 1969). El azufre puede disminuir la acumulación de nitrógeno soluble, incluyendo los nitratos (Pasricha y Randhawa, 1975). Esta reducción de nitratos es parcialmente atribuida a un contenido de azúcares totales alto, como sugirieron Wright y Davison (1964), además del efecto de dilución por la estimulación del crecimiento. El incremento en el contenido de nitrógeno en estos experimentos puede ser imputado principalmente a la fijación de nitrógeno molecular por la simbiosis bacteriana. Anderson y Spencer (1950) informaron que la aplicación de azufre afecta indirectamente la fijación de nitrógeno porque incrementa el número de nódulos, efecto no observado en este trabajo, aunque sí se ha puesto de manifiesto que estimula la actividad nitrogenosa produciendo nódulos más eficientes. La consecuencia de la expresión correcta de esta característica simbiótica es la secuencia de procesos que tienen lugar en el nódulo y que conducen a la reducción del nitrógeno atmosférico a amoníaco.

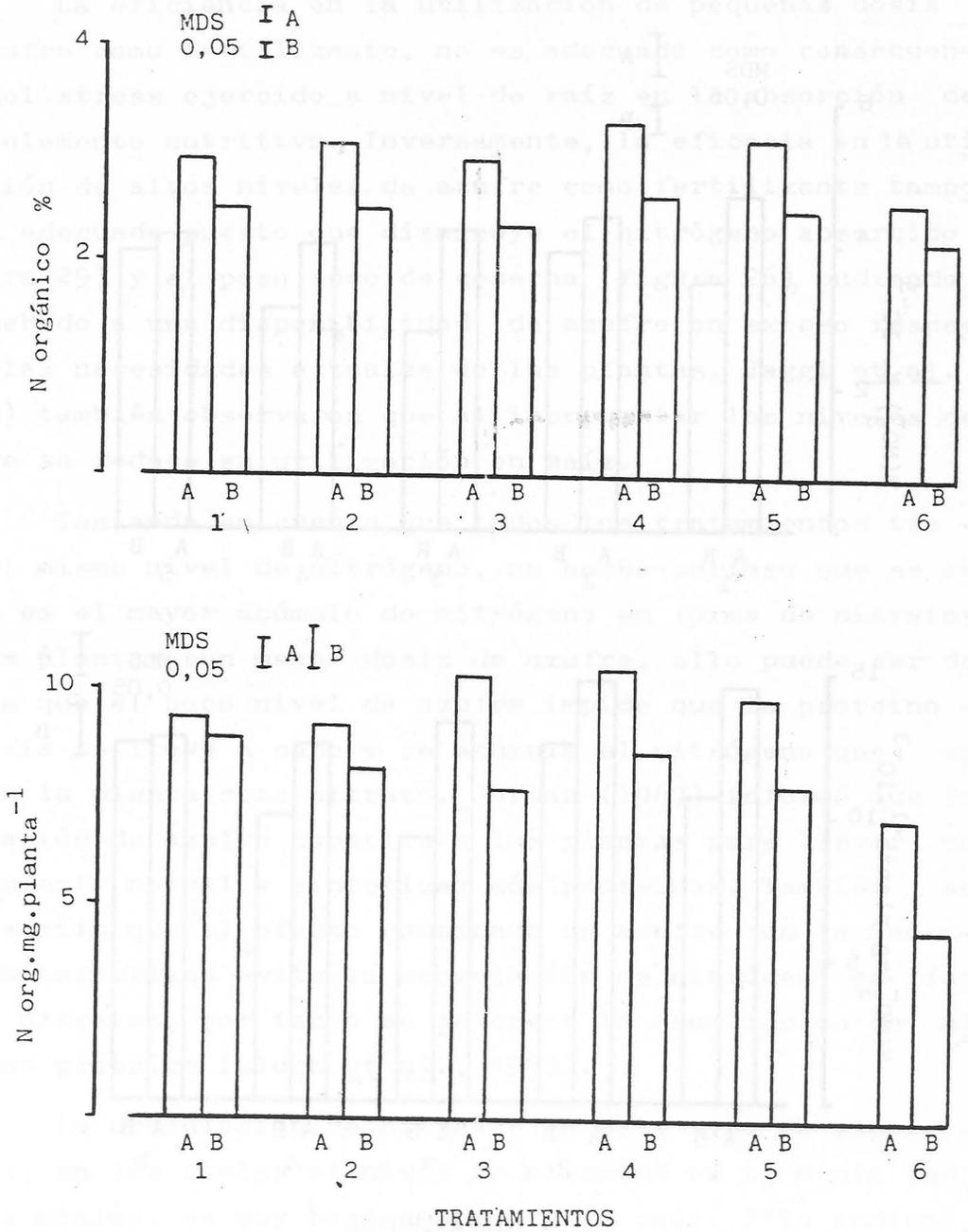


Fig. 29.- Contenido de nitrógeno en % de peso seco (Diagrama superior) y en mg.planta⁻¹ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa, para cada tratamiento realizado. Parte aérea (A); raíz (B). Experimentos tipo A.

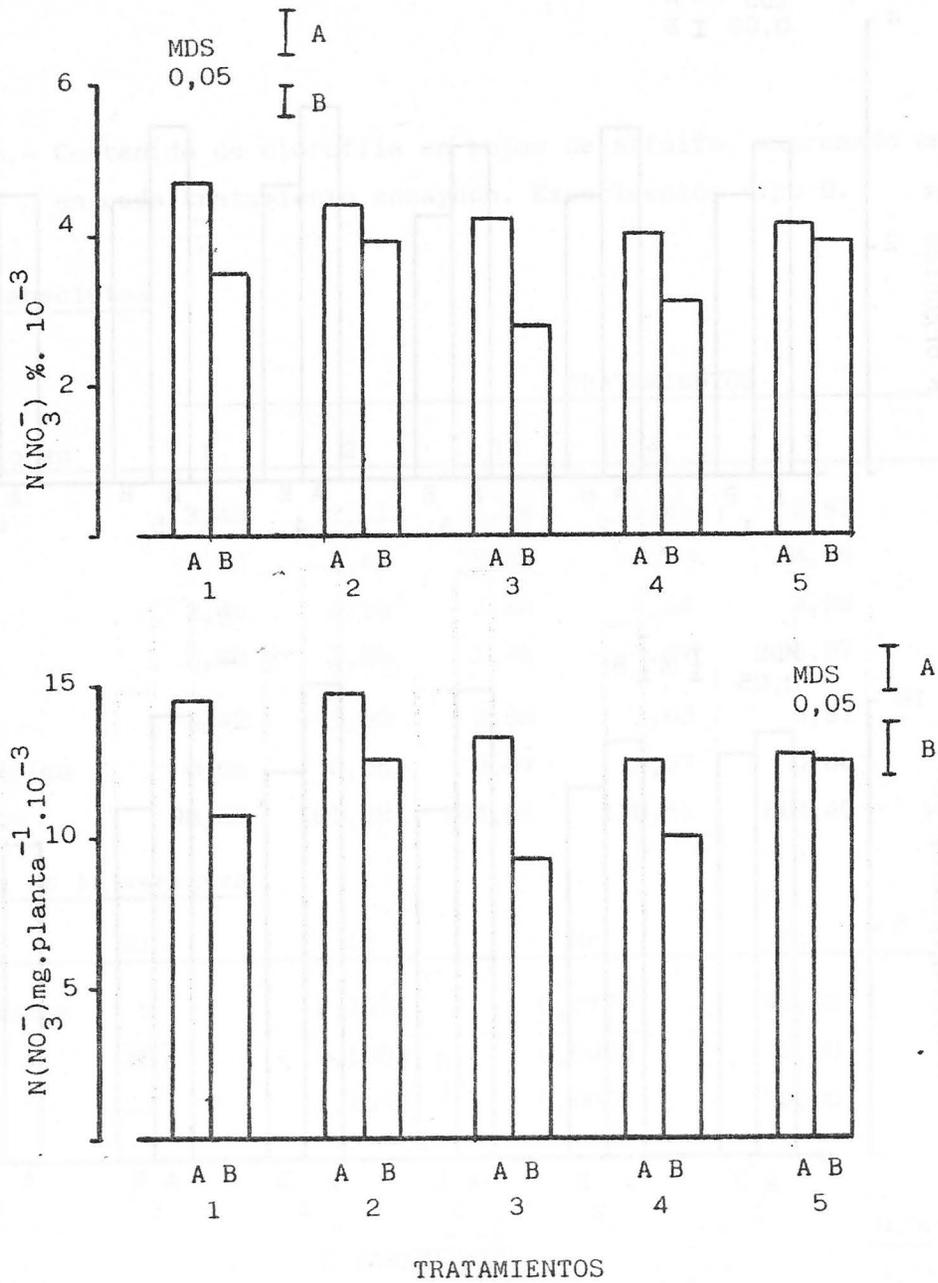


Fig. 30.- Contenido de nitrógeno en forma de nitratos, expresado en $\% \cdot 10^{-3}$ de peso seco (Diagrama superior) y en $\text{mg.planta}^{-1} \cdot 10^{-3}$ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa, para cada tratamiento realizado. Parte aérea (A); raíz (B). Experimentos tipo B.

La eficiencia en la utilización de pequeñas dosis de azufre como fertilizante, no es adecuada como consecuencia del stress ejercido a nivel de raíz en la absorción de este elemento nutritivo. Inversamente, la eficacia en la utilización de altos niveles de azufre como fertilizante tampoco es adecuada puesto que disminuye el nitrógeno absorbido (figura 29) y el peso seco de cosecha (figura 26), pudiendo ser debido a una disponibilidad de azufre en exceso respecto a las necesidades actuales de las plantas. Jaggi et al. (1977) también observaron que al incrementar los niveles de azufre se reduce su utilización en maíz.

Teniendo en cuenta que todos los tratamientos tienen el mismo nivel de nitrógeno, un hecho curioso que se observa es el mayor acúmulo de nitrógeno en forma de nitratos en las plantas con menor dosis de azufre, ello puede ser debido a que el poco nivel de azufre impide que la proteínosíntesis se lleve a cabo y se acumule el nitrógeno que entra en la planta como nitrato. Jordan (1967) informó que la aplicación de azufre capacita a las plantas para llevar un crecimiento normal y sintetizar más proteínas. También se ha descrito que el efecto combinado de azufre con la inoculación bacteriana evita la acumulación de nitrógeno en forma de nitratos, por tanto se favorece la acumulación de nitrógeno proteico (Lluch et al., 1983).

La acumulación de nitratos en este tipo de experimentos, en los cuales el nivel de nitratos en el medio radical es mínimo, es muy baja en hoja y en raíz. Ello indica, que en estas condiciones no existe "pool" de almacenamiento de nitratos (Jackson y Volk, 1981). El nivel de nitratos (figura 30) que se ha determinado en la parte aérea y raíz de alfalfa es relativamente bajo respecto al normal descrito en la bibliografía para dichos órganos vegetales (Blanc y Morisot, 1980), sin duda debido al ya indicado nivel de nitrógeno que lleva la solución de cultivo.

El menor acúmulo de nitratos en las plantas cultivadas con dosis crecientes de sulfatos indica, que el nitrógeno orgánico que han acumulado estas plantas procede fundamentalmente de la fijación de nitrógeno atmosférico que se transforma en amonio en el nódulo radical (Atkins et al., 1975) y no se transporta como anión. Además Arora y Luthra (1971) indicaron que la fertilización azufrada favorece que el nitrógeno en forma de nitratos disminuya, pudiendo afectar positivamente la actividad nitrato reductasa como anteriormente se indicó.

Azufre y Sulfatos.

El azufre absorbido por el cultivo incrementa significativamente con los sucesivos niveles de sulfatos aplicados (figura 31), tanto en parte aérea como en raíz, observándose que el aumento y los niveles de azufre son bastante semejantes en ambos órganos. Sin embargo, en muchos tratamientos el nivel de azufre alcanzado no llega al del testigo, siendo inferior a éste cuando se utilizan dosis pequeñas de azufre. Ello puede ser atribuido a la propia composición de la solución nutritiva que lleva el tratamiento testigo o al efecto de dilución debido al mayor crecimiento alcanzado en estos tratamientos. Sacchidanand et al. (1980) describieron resultados semejantes en cuanto a la concentración de azufre en tejidos vegetales.

Los niveles de sulfatos aumentan con el nivel de azufre en el medio de cultivo, efecto observado por Spencer (1978). Sin embargo, puesto que el metabolismo del nitrógeno y del azufre en vegetales son procesos íntimamente ligados, se debe intuir que el tipo de nutrición nitrogenada puede influir en la absorción de azufre. De hecho, en experimentos realizados en judía (P.vulgaris), se puso de manifiesto que de las dos formas de suministrar nitrógeno a las leguminosas, fijación biológica y abonado nitrogenado, la pri

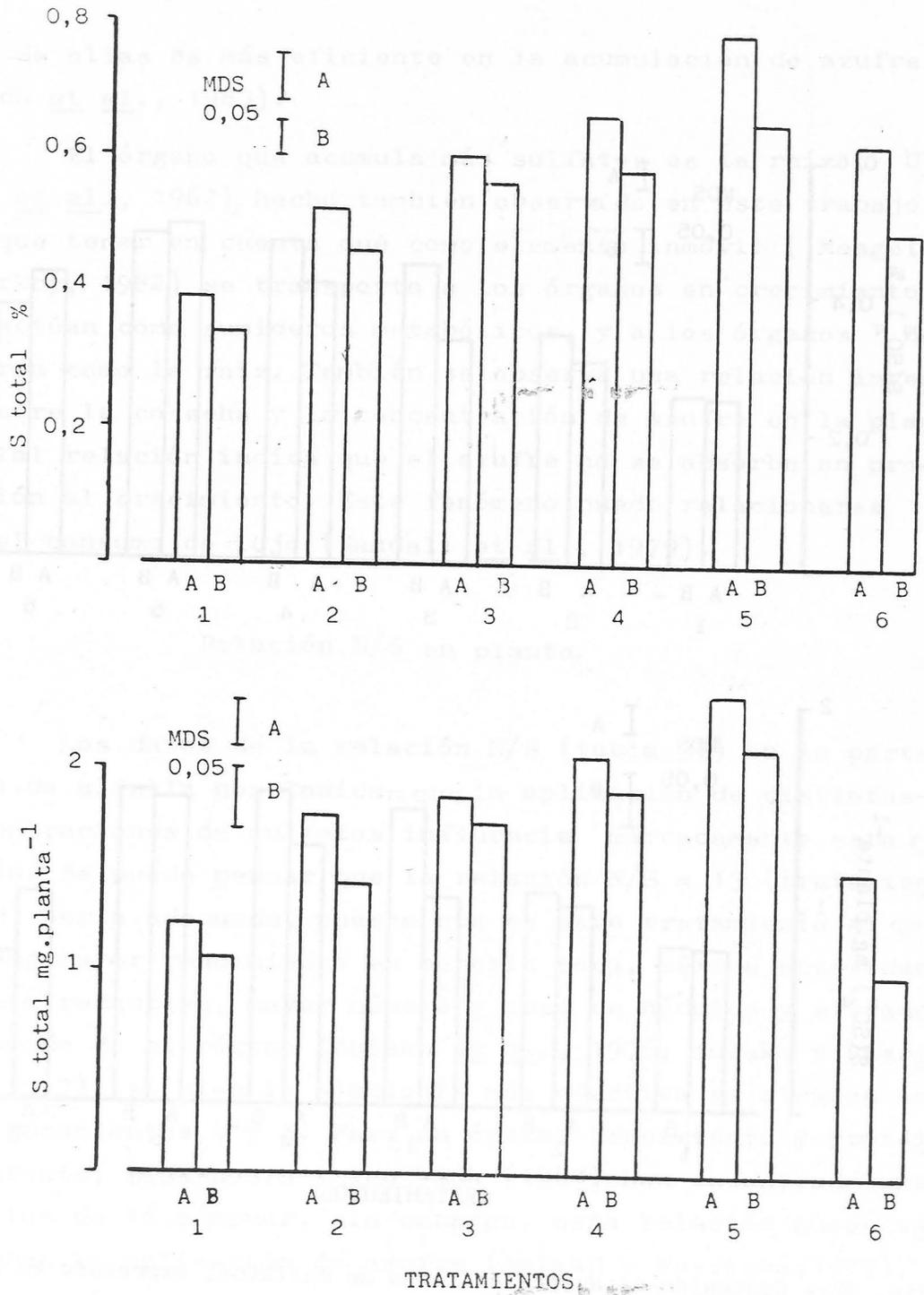


Fig. 31.- Contenido de azufre total, expresado en % de peso seco (Diagrama superior) y en mg.planta⁻¹ (Diagrama inferior) - en plantas de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Parte aérea (A); raíz (B). Experimentos tipo B.

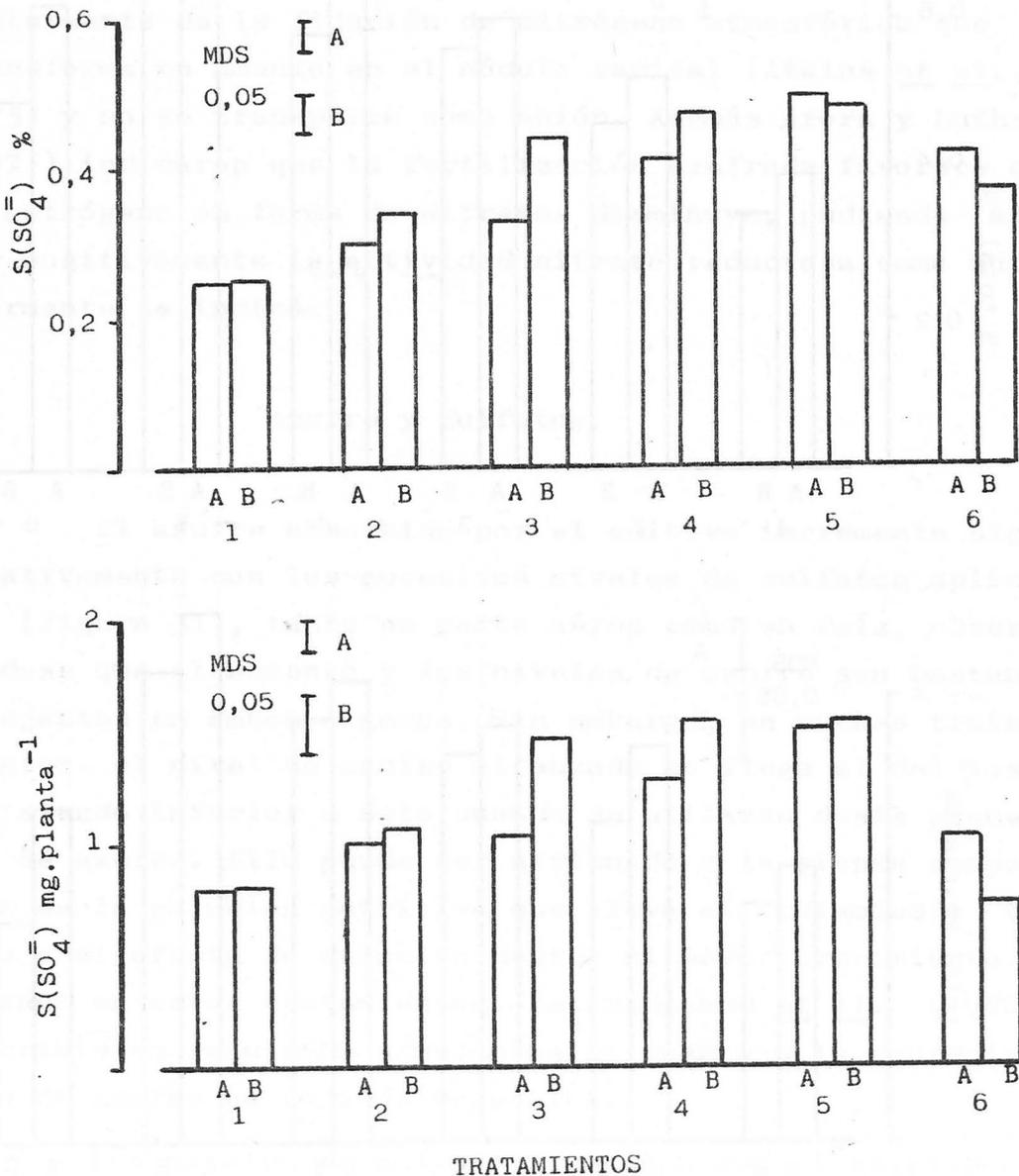


Fig. 32.- Contenido de azufre en forma de sulfatos, expresado en % de peso seco (Diagrama superior) y en $mg.planta^{-1}$ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa, para cada tratamiento ensayado. Parte aérea (A); raíz (B). Experimentos tipo B.

mera de ellas es más eficiente en la acumulación de azufre (Lluch et al., 1983).

El órgano que acumula más sulfatos es la raíz (Ulrich et al., 1967), hecho también observado en este trabajo. Hay que tener en cuenta que como elemento inmóvil (Mengel y Kirkby, 1982) se transporta a los órganos en crecimiento, que actúan como sumideros metabólicos, y a los órganos de reserva como la raíz. También se observa una relación inversa entre la cosecha y la concentración de azufre en la planta. Tal relación indica que el azufre no se absorbe en proporción al crecimiento. Este fenómeno puede relacionarse con el consumo de lujo (Randall et al., 1979).

Relación N/S en planta.

Los datos de la relación N/S (tabla 37) en la parte aérea de alfalfa nos indican que la aplicación de distintas concentraciones de sulfatos influencia marcadamente esta relación. Se puede pensar que la relación N/S = 13 (tratamiento 2S) sería adecuada, puesto que es este tratamiento el que obtiene mayor rendimiento en materia seca, máxima actividad nitrato reductasa, mayor número y peso de nódulos y elevado contenido de nitrógeno (Aulakh et al., 1976; Aulakh y Pasricha, 1977), si bien la simbiosis más efectiva se alcanza en los tratamientos 4 y 5. Para un óptimo crecimiento y proteinosíntesis, Dijkshoorn y Van Wijk (1967) han encontrado una relación de 16 o menor, sin embargo, esta relación puede variar con la aplicación de azufre (Aulakh y Pasricha, 1977).

Caldwell et al. (1969) encuentran en alfalfa que la relación N/S es de 19, en plantas no tratadas con azufre, y disminuye con el incremento en la aplicación de este elemento. En estos resultados se obtuvieron valores muy semejantes (N/S = 20) para el tratamiento 1S, lo que indica una gran deficiencia de azufre (Metson, 1973; Ligero y Lluch ,

Tabla 37.- Resultados relativos a la relación N/S en parte aérea de alfalfa, en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo B.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	21,64	13,70	12,94	9,98	11,80	14,13
2	23,01	16,38	12,67	9,58	10,59	13,36
3	20,77	12,74	12,86	11,87	9,89	16,03
4	22,20	11,89	12,86	11,45	12,54	16,92
Media	21,91	13,68	12,83	10,72	11,08	15,11
Desv. típica	81	1,68	0,09	0,96	0,98	1,42
% testigo	145	90	85	71	73	100

Análisis de la varianza

Fv	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	336,9108	67,3821	40,63	0,001
Error	18	29,8454	1,6580	0,00	
Total	23	366,7563	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad		<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos		1,912	2,613	3,569

Tabla 38.- Resultados relativos a la relación N/S en raíz de alfalfa, en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo B.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	27,52	20,18	22,69	11,43	13,82	20,64
2	25,78	21,04	19,17	15,19	15,75	18,37
3	28,65	24,69	19,33	16,19	12,11	19,74
4	24,00	20,59	17,30	16,69	14,83	17,48
Media	26,49	21,62	19,62	14,88	14,13	19,06
Desv. típica	1,76	1,79	1,94	1,06	1,34	1,21
% testigo	138,98	113,46	102,97	78,07	74,14	100,00

Análisis de la varianza

Fv	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	393,7339	78,7467	20,05	0,001
Error	18	70,6692	3,9260	0,00	
Total	23	464,4032	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	0,05	0,01	0,001
Tratamientos	2,942	4,021	5,492



1982). Valores semejantes fueron encontrados en los experimentos anteriores cuando la relación N/S en el medio de cultivo era muy elevada, creándose un desequilibrio debido a una demanda de azufre. Martel y Zizka (1977) indicaron, que para la alfalfa, los valores entre 17 - 32 están en la zona de deficiencia de azufre, y esa variación depende del tipo de suelo.

En general, la relación N/S incrementa cuando las dosis de azufre son muy bajas y disminuye con el incremento de azufre (Spencer et al., 1977). Sin embargo, se ha observado que la relación N/S es mucho mayor en raíz que en parte aérea, ello es debido sin duda a que la raíz acumula menos azufre orgánico ya que la acumulación del azufre ocurre prioritariamente en hoja al ser considerado un elemento in móvil.

El intentar definir una relación N/S óptima, que sea índice de la concentración de azufre adecuada para la alfalfa, es difícil; puesto que muchos factores pueden producir alteraciones, por tanto es importante hablar de un rango de valores. Sin embargo, si la relación N/S es relativamente estable, es un criterio para diagnosis muy bueno (Spencer, 1978). Radford et al. (1977) lo han relacionado incluso con las concentraciones de metionina y cisteína en soja.

Otros macronutrientes : Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio.

El FOSFORO absorbido por la planta refleja el antagonismo existente con el azufre (Leidi y Gómez, 1980). El antagonismo se pone de manifiesto en la parte aérea de las plantas de alfalfa. Los informes del efecto depresivo de la aplicación de azufre en la disponibilidad y absorción del fósforo en distintos cultivos han sido frecuentes (Caldwell et al., 1969; Aulakh y Dev, 1975). Las aplicaciones de azu-

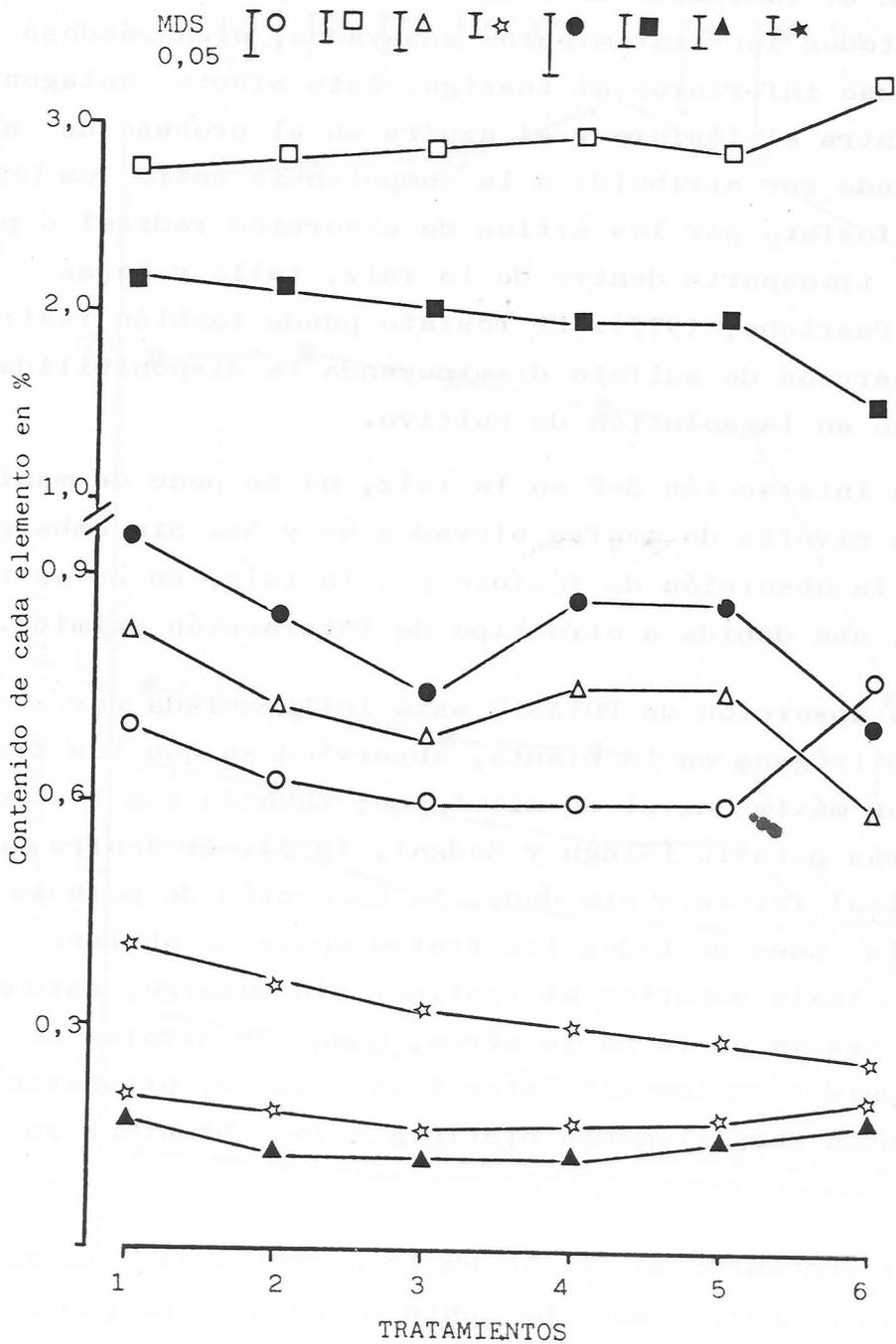


Fig. 33.- Contenido de P(O), K(\square), Ca(Δ), y Mg(\star), e parte aérea (símbolos en blanco) y en raíz (símbolos en negro) de plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo B.

fre reducen el contenido de fósforo en la parte aérea de alfalfa, en todos los tratamientos ensayados, alcanzándose valores incluso inferiores al testigo. Este efecto antagonista mutuo entre el fósforo y el azufre en el proceso de absorción puede ser atribuido a la competencia entre los iones sulfato y fosfato por los sitios de absorción radical o por la vía de transporte dentro de la raíz, tallo y hojas (Aulakh y Pasricha, 1977). El fosfato puede también restringir la absorción de sulfato disminuyendo la disponibilidad del sulfato en la solución de cultivo.

La interacción S-P en la raíz, no se pone de manifiesto con niveles de azufre elevados 4S y 5S. Sin embargo, puede que la absorción de fósforo por la raíz, en estos tratamientos, sea debida a otro tipo de interacción química.

La absorción de POTASIO está influenciada por el nivel de nitrógeno en la planta, observándose que los tratamientos con máximo nivel de nitrógeno, también son los que absorben más potasio (Singh y Modgal, 1978). El azufre en el medio radical favorece sin duda, la absorción de potasio por la raíz, pues en todos los tratamientos se obtiene un nivel de potasio superior al testigo. Sin embargo, este efecto no se observa en la parte aérea, pues los niveles de potasio obtenidos en los distintos tratamientos, presentan una tendencia completamente distinta a los obtenidos en raíz.

El contenido de CALCIO en la parte aérea y la raíz presenta un comportamiento bastante semejante. Se puede decir que el nivel de calcio en el vegetal ha aumentado, respecto al testigo, sin embargo no existe una correlación perfecta entre el nivel de sulfato en el medio radical y el calcio absorbido por la planta, ya que el nivel de azufre en el medio es creciente y la tendencia del calcio en la planta presenta un punto de inflexión en el tratamiento 3S. Estos resultados se podrían interpretar en virtud de la in

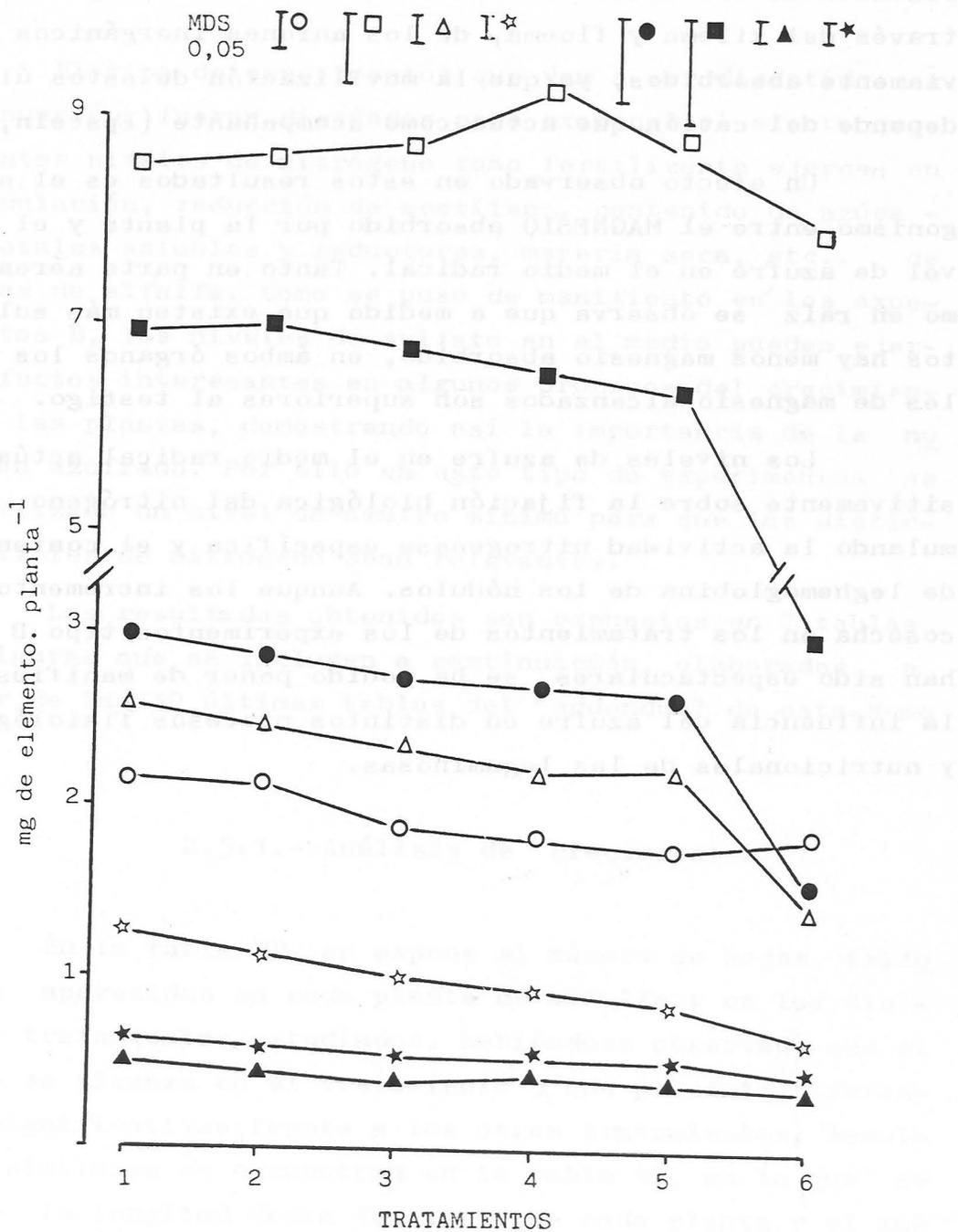


Fig. 34.- Contenido de P(O), K(□),Ca(Δ) y Mg(☆), en parte aérea (símbolos en blanco) y en raíz (símbolos en negro) de plantas de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimento tipo B.

fluencia de los distintos cationes sobre el transporte, a través del xilema y floema, de los aniones inorgánicos previamente absorbidos, ya que la movilización de estos últimos depende del catión que actúa como acompañante (Epstein, 1972).

Un efecto observado en estos resultados es el antagonismo entre el MAGNESIO absorbido por la planta y el nivel de azufre en el medio radical. Tanto en parte aérea como en raíz se observa que a medida que existen más sulfa-tos hay menos magnesio absorbido, en ámbos órganos los niveles de magnesio alcanzados son superiores al testigo.

Los niveles de azufre en el medio radical actúan positivamente sobre la fijación biológica del nitrógeno, estimulando la actividad nitrogenasa específica y el contenido de leghemoglobina de los nódulos. Aunque los incrementos de cosecha en los tratamientos de los experimentos tipo B no han sido espectaculares, se ha podido poner de manifiesto la influencia del azufre en distintos procesos fisiológicos y nutricionales de las leguminosas.

2.3.- Experimentos Tipo C.

El tipo de experimentos que van a ser discutidos a continuación, fueron diseñados para examinar el efecto que distintos niveles de nitrógeno como fertilizante ejercen en la nodulación, reducción de acetileno, contenido de azúcares totales solubles y reductores, materia seca, etc.. de plantas de alfalfa. Como se puso de manifiesto en los experimentos B, los niveles de sulfato en el medio pueden ejercer efectos interesantes en algunos procesos del crecimiento de las plantas, demostrando así la importancia de la nutrición azufrada. Por ello en este tipo de experimentos se ha utilizado un nivel de azufre mínimo para que los distintos niveles de nitrógeno sean relevantes.

Los resultados obtenidos son expuestos en 7 tablas y 9 figuras que se incluyen a continuación, elaboradas a partir de las 59 últimas tablas del "addendum" de esta Memoria.

2.3.1.- Análisis de Crecimiento.

En la tabla 39, se expone el número de hojas trifoliadas aparecidas en cada planta de alfalfa y en los distintos tratamientos estudiados, habiéndose observado que el máximo se alcanza en el tratamiento 5, que presenta diferencias significativas frente a los otros tratamientos. Resultados similares se encuentran en la tabla 40, en la que se expone la longitud media del tallo de cada planta y el análisis de la varianza correspondiente, que muestra una significación bastante alta ($P = 0,01$).

Los resultados referentes al peso fresco de parte aérea y raíz de alfalfa se exponen en la tabla 41 (tablas CLXXI a la CLXXIV del "addendum"). Se aprecia que el tratamiento 5 da lugar a un desarrollo de la parte aérea mayor,

Tabla 39.- Resultados relativos al número de hojas trifoliadas en plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	35,75	35,25	39,00	36,25	42,50	21,62
2	35,25	34,87	37,75	32,87	41,87	22,25
3	34,75	30,12	34,87	34,12	39,75	25,00
4	32,62	33,62	32,87	32,87	39,12	23,25
Media	34,59	33,46	36,12	34,03	40,81	23,03
Desv. típica	1,19	2,02	2,39	1,37	1,41	1,27
% testigo	150,20	145,31	156,85	147,76	177,20	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	684,9973	136,9994	36,73	0,001
Error	18	67,1249	3,7291	0,00	
Total	23	752,1223	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	0,05	0,01	0,001
Tratamientos	2,867	3,918	5,352

Tabla 40.- Resultados relativos a la longitud del tallo por planta de alfalfa, expresado en cm, para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	57,75	62,75	67,00	65,50	68,75	47,75
2	62,50	61,50	65,87	62,62	63,25	43,12
3	49,75	64,50	66,12	60,25	70,00	55,00
4	56,12	56,75	56,50	70,37	63,12	58,00
Media	56,53	60,37	63,87	64,68	66,28	50,96
Desv. típica	4,56	2,27	4,27	3,77	3,12	5,86
% testigo	110,91	120,41	125,32	126,91	130,04	100,00

Análisis de la varianza

Fv	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	678,4953	135,6990	5,77	0,01
Error	18	423,1445	23,5080	0,00	
Total	23	1101,6398	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos	7,199	9,839	13,439

Tabla 41.- Resultado relativos al peso fresco de hoja, tallo, parte aérea y raíz de alfalfa, expresado en gramos, para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

TRATAMIENTOS		PESO FRESCO			
		Hoja	Tallo	Parte aérea	Raíz
1	\bar{X}	5,74	4,62	10,37	12,95
	%	139	152	145	169
2	\bar{X}	6,00	4,92	10,80	13,37
	%	147	162	151	175
3	\bar{X}	6,44	4,36	11,03	14,81
	%	156	150	154	194
4	\bar{X}	6,45	4,79	11,25	14,59
	%	156	158	157	190
5	\bar{X}	7,28	5,29	13,64	14,67
	%	147	174	190	192
6	\bar{X}	4,13	3,03	7,17	7,66
		100	100	100	100
Probabilidad		0,001	0,001	0,001	0,001
0,05		0,590	0,642	1,127	1,850
M.D.S. 0,01		0,806	0,878	1,541	2,501
0,001		1,101	1,199	2,105	3,416

respecto al testigo, incrementando el peso en un 90 %. Sin embargo, ya desde el tratamiento 1, se observa un aumento de peso fresco sustancial respecto al testigo. El máximo crecimiento de raíz se alcanza en el tratamiento 3, manteniéndose constante ese incremento en el 4 y 5. En ellos el desarrollo radical casi se duplica respecto al testigo.

La figura 35 contiene los valores medios de peso seco de tallo, hoja, ámbos conjuntamente (parte aérea) y raíz de alfalfa que han sido detallados en las tablas CLXXV, - CLXXVI, CLXXVII y CLXXVIII del "addendum". Se observa, ya en el tratamiento 1, que el incremento respecto al testigo tanto en raíz como en parte aérea es de alrededor de un 50 % (resultados semejantes a los detectados en la tabla 41) y ese incremento se mantiene bastante constante a medida que los nitratos de la solución de cultivo disminuyen, pero en el tratamiento 5 se observa un incremento más espectacular. Este comportamiento se debe sin duda, teniendo en cuenta que el nivel de nitratos es el más pequeño, al equilibrio que debe existir entre niveles de nitratos y sulfatos, en el medio de cultivo, que permitirá el establecimiento de una simbiosis más efectiva.

La aplicación de fertilizantes nitrogenados a leguminosas forrajeras es económicamente rentable sólo si produce un incremento de cosecha y un forraje con más calidad. El peso seco de alfalfa en (hojas y tallos) se incrementa significativamente (184 % respecto al testigo) con la 1^o dosis de nitrógeno como fertilizante (tratamiento 5). Sin embargo, con las dosis siguientes 2N, 3N, 4N, 5N el incremento fue menor y constante. Resultados similares encuentran Friedrich et al. (1977) en otras forrajeras. Podemos decir por tanto que, en cuanto a la rentabilidad del cultivo, la alfalfa utiliza muy bien bajos niveles de nitrógeno como fertilizante porque incluso potencia la fijación de nitrógeno, máxima actividad nitrogenasa figura 36, mientras que una fertilización nitrogenada excesiva puede tener poco efecto en el crecimiento de la cosecha (Vance y Heichel, 1981).

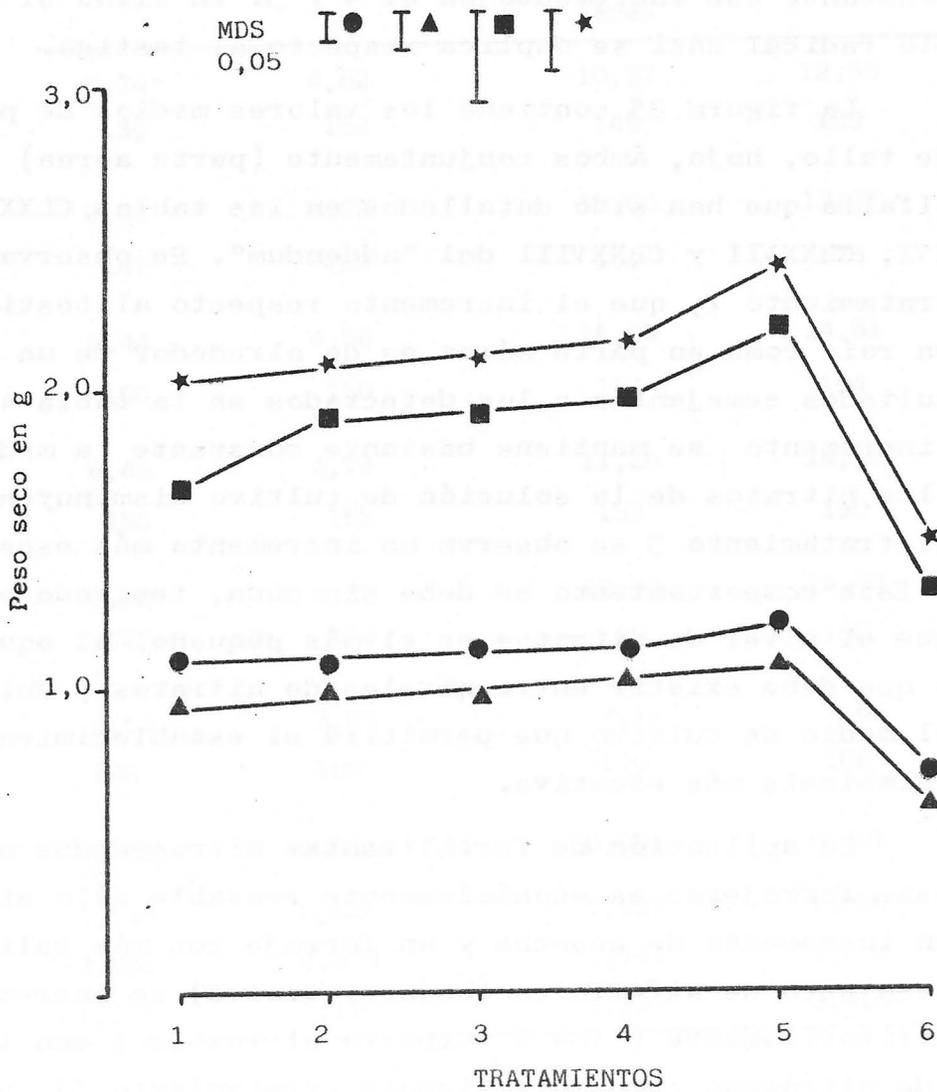


Fig. 35.- Peso seco medio de hoja (●), tallo(▲), raíz(■) y parte aérea (★) de plantas de alfalfa, en cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

Tabla 42.- Resultados relativos a la relación peso seco de raíz/peso seco de parte aérea en plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos C.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	0,78	0,92	0,91	0,91	0,84	0,69
2	0,74	0,74	0,96	0,88	1,00	0,62
3	0,74	0,93	0,82	0,89	0,93	0,77
4	0,88	0,89	0,90	0,84	1,16	0,74
Media	0,78	0,87	0,90	0,88	0,98	0,71
Desv. típica	0,05	0,07	0,04	0,03	0,11	0,05
% testigo	111,19	124,11	127,21	124,45	138,94	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	0,1811	0,0362	5,51	0,01
Error	18	0,1183	0,0065	0,00	
Total	23	0,2994	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos	0,120	0,164	0,224

Un parámetro estudiado en este tipo de experimentos es la relación entre los pesos secos de raíz y parte aérea, relación que se expone en la tabla 42, encontrándose valores crecientes desde 0,78 para el tratamiento 1 a 0,98 para el tratamiento 5, todos ellos superiores al testigo, índice de que, comparativamente, el metabolismo radical es más intenso a medida que la relación aumenta.

Es un hecho común en la mayoría de las leguminosas, que cuando crecen dependiendo mayoritariamente de la fijación del nitrógeno atmosférico, no crecen tan rápidamente como plantas similares, suplementadas con una fuente de nitrógeno inorgánico (Ryle et al., 1979). Esto podría explicar el efecto observado con las plantas testigo que muestran gran diferencia en su crecimiento con los tratamientos realizados.

El crecimiento radical de sistemas nodulados es menor que en sistemas no nodulados que se desarrollan con nitratos (Ligero et al., 1981 a). Parece esperarse que a medida que hubiera más nitrato en el medio, el crecimiento radical fuera mayor y el número de nódulos menor pero no ocurre lo primero y sí lo segundo. Sin embargo, esto no impide que exista un equilibrio entre las actividades de la raíz y del tallo, ya que la relación entre peso y raíz y parte aérea va disminuyendo a medida que existe un nivel de nitrato más alto en el medio de cultivo (Clement et al., 1978; Ryle et al., 1979).

2.3.2.- Nodulación y Fijación de Nitrógeno.

Los resultados concernientes al proceso de nodulación se han reflejado en la figura 36, en la cual se indican los siguientes parámetros : número de nódulos, peso seco de los mismos, actividad nitrogenasa específica (expresada en $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y contenido de leghemoglo-

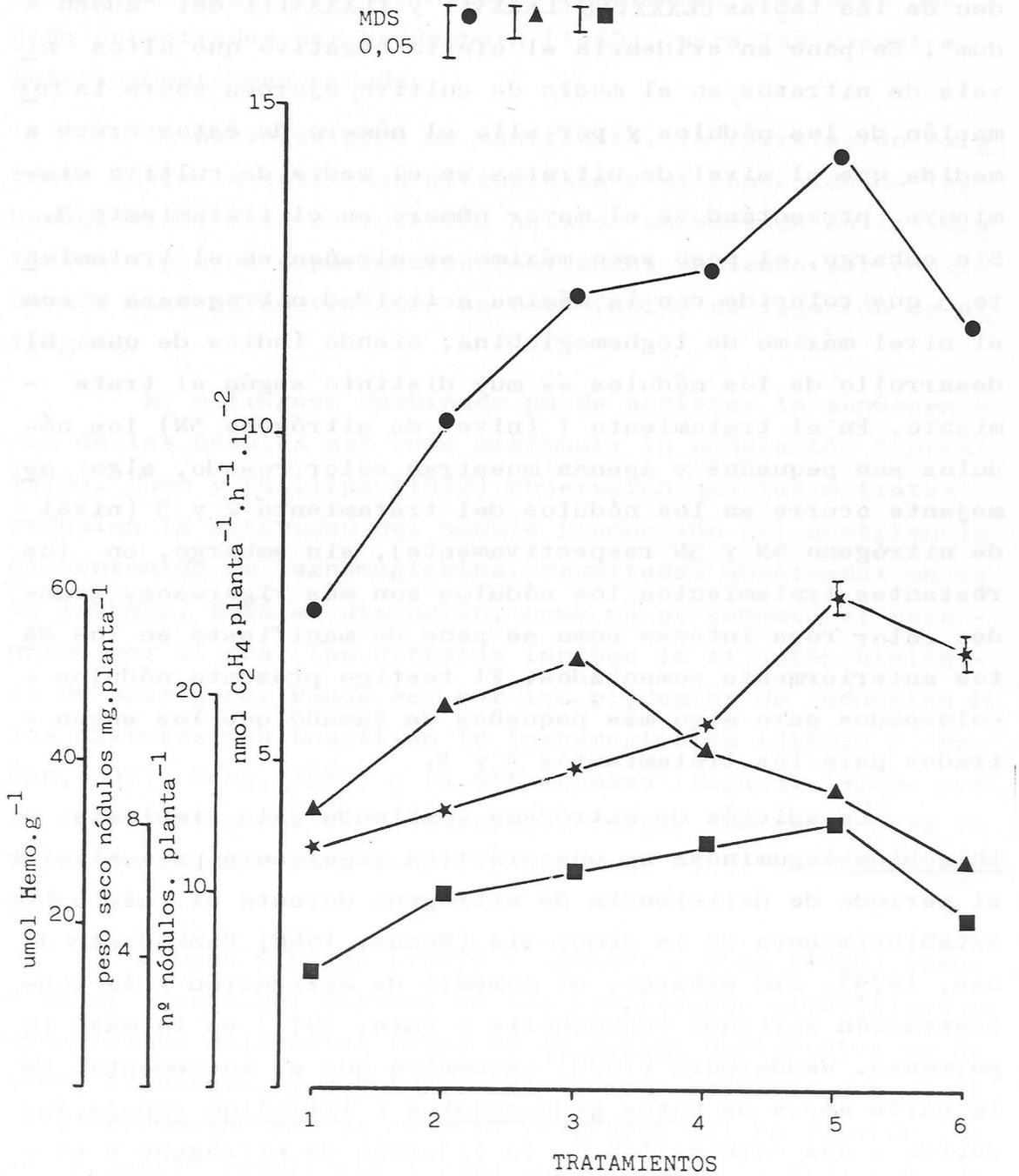


Fig. 36.- Actividad nitrogenasa específica (●), número de nódulos (▲), peso seco de nódulos(■) y contenido en leghemoglobina(★) para los distintos tratamientos realizados. Experimentos tipo C.

bina en los nódulos de alfalfa, expresada en $\mu\text{mol Hemo.g}^{-1}$. Los datos de los tres primeros parámetros indicados proceden de las tablas CLXXXVII, CLXXXVII y CLXXXVIII del "addendum". Se pone en evidencia el efecto negativo que altos niveles de nitratos, en el medio de cultivo, ejercen sobre la formación de los nódulos y por ello el número de éstos crece a medida que el nivel de nitratos en el medio de cultivo disminuye, presentándose el mayor número en el tratamiento 3. Sin embargo, el peso seco máximo se alcanza en el tratamiento 5 que coincide con la máxima actividad nitrogenasa y con el nivel máximo de leghemoglobina, siendo índice de que el desarrollo de los nódulos es muy distinto según el tratamiento. En el tratamiento 1 (nivel de nitrógeno 5N) los nódulos son pequeños y apenas muestran color rosado, algo semejante ocurre en los nódulos del tratamiento 2 y 3 (nivel de nitrógeno 4N y 3N respectivamente), sin embargo, en los restantes tratamientos los nódulos son más vigorosos, grandes, color rosa intenso como se pone de manifiesto en los datos anteriormente comentados. El testigo presenta nódulos coloreados pero algo más pequeños de tamaño que los encontrados para los tratamientos 4 y 5.

La adición de nitrógeno combinado a la simbiosis Rhizobium-leguminosa es una práctica importante para aliviar el periodo de deficiencia de nitrógeno durante el inicio del establecimiento de la simbiosis (Munns, 1968; Pankhurst y Jones, 1979). Sin embargo, el momento de aplicación y la concentración aplicada (Oghoghorie y Pate, 1971) es lo más importante. Wedderburn (1983) encuentra que el incremento de la parte aérea de Lotus pedunculatus y Trifolium repens, fue debido a una combinación de la fijación de nitrógeno y el nitrógeno adicionado en pequeñas dosis. Resultados semejantes han sido observados en este estudio con plantas de alfalfa. Además, ese nivel de nitrógeno puede contribuir al crecimiento radical, lo que conlleva un incremento de sitios de infección y por tanto del número de nódulos, niveles de 3.18 meq/l. de nitrógeno como nitrato son adecuados para la

nodulación y los de 11.61 meq/l eran adversos para la infección y el desarrollo del nódulo, resultados similares han sido encontrados por Wedderburn (1983), para las especies anteriormente mencionadas.

De nuevo se pone de manifiesto, la correlación existente entre la actividad nitrogenasa y el contenido de leghemoglobina, esta correlación ha sido encontrada en los distintos tipos de experimentos realizados pudiendo ser considerado éste parámetro como un buen índice de fijación de nitrógeno.

El nitrógeno combinado puede acelerar la senescencia de los nódulos así como disminuir la nodulación (Sprent 1979). Chen y Phillips (1977) observaron que los nitratos reducían la actividad del nódulo (reducción del acetileno) y el contenido de leghemoglobina, resultados observados en este trabajo. Está en discusión, como ya se comentó, el mecanismo por el cual los nitratos inhiben la fijación biológica de nitrógeno. Puede ser por los productos de reducción de los nitratos que inactivan la leghemoglobina (Gibson y Pagan, 1977; Wong, 1980) o la nitrogenasa (Rigaud, 1976) o por la competencia por el fotosintato, factor limitante para la fijación de nitrógeno (Small y Leonard, 1969; Skrdleta et al., 1980).

Gibson y Pagan (1977) y Manhart y Wong (1980) estudian el efecto del nitrato en las propiedades simbióticas de mutantes de diferentes razas de Rhizobium deficientes en nitrato reductasa, y concluyen que es poco probable que el nitrato producido por la nitrato reductasa del bacteroide tenga un papel significativo como inhibidor de la fijación de nitrógeno en nódulos radicales de leguminosas.

Los resultados de esta memoria no apoyan la hipótesis de Small y Leonard (1969), puesto que se ha podido observar, que las plantas con mayor actividad nitrato reductasa en hojas también pueden presentar una gran actividad nitro-

Tabla 43.- Contenido de clorofila en hojas de alfalfa, expresado en mg.g^{-1} , para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	3,40	3,23	3,84	3,97	3,49	3,63
2	3,58	3,30	3,63	3,85	3,63	3,33
3	3,62	3,75	3,63	3,96	3,50	3,33
4	3,60	3,65	3,79	4,16	3,40	3,42
Media	3,55	3,48	3,72	3,98	3,52	3,42
Desv. típica	0,08	0,22	0,09	0,11	0,06	0,12
% testigo	103,57	101,60	108,60	116,26	102,84	100,00

Análisis de la varianza

Fv	Gl	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	0,8539	0,1707	7,93	0,001
Error	18	0,3876	0,0215	0,00	
Total	23	1,2415	0,0000	0,00	
<u>M.D.S.</u>					
Probabilidad			<u>0,05</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>
Tratamientos			0,217	0,297	0,406

genasa en sus nódulos, en ambos casos con resultados estadísticamente significativos, que hay nódulos con una gran actividad nitrato reductasa y que a la vez muestran una actividad nitrogenasa alta, y en los tratamientos que presentan una actividad nitrato reductasa similar en hojas, en nódulos o en raíz, los niveles de actividad nitrogenasa en nódulos presentan diferencias muy significativas. En cualquier caso la fijación de nitrógeno no parece estar limitada por las disponibilidades de fotoasimilados, el efecto del nitrato se debe ejercer a otros niveles como antes se ha comentado.

La discusión abierta sobre el modo en que el nitrógeno actúa de inhibidor de la fijación, así como las controversias suscitadas han sido evidenciadas. Sin embargo, hay autores que señalan al nitrógeno como elemento que influye en la acción del ácido indol acético (Valera y Alexander, 1965) ya que la hormona mitiga la inhibición de la nodulación por nitratos (Tanner y Anderson, 1963). A través de los resultados de esta memoria podemos evidenciar que la fitohormona implicada en el efecto inhibidor de los nitratos es el etileno.

2.3.3.- Determinaciones Bioquímicas.

Clorofila.

El contenido de clorofila en hojas de alfalfa que se expone en la tabla 43 indica que el nivel de clorofila alcanzado en cada uno de los tratamientos ensayados es bastante similar, señalando una tendencia a aumentar a medida que el nivel de nitratos disminuye. En este tipo de experimentos se puede hablar de paralelismo entre la reducción de acetileno (figura 36), la superficie foliar (tabla 39 y 41) y el contenido de clorofila, tabla CLXXIX del "addendum" donde este parámetro se expresa en mg. planta^{-1} , siendo ello -

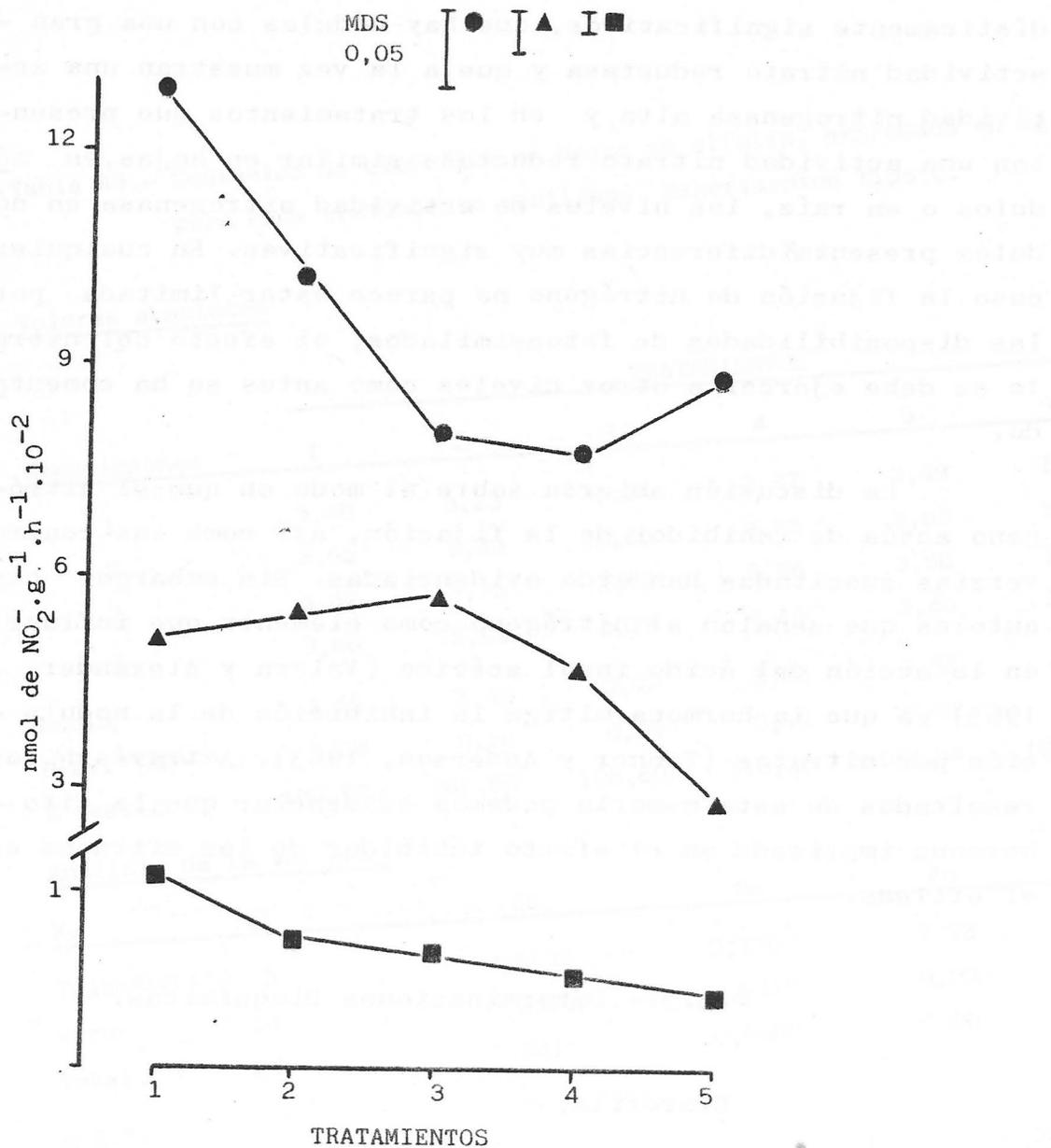


Fig. 37.- Actividad nitrato reductasa en hojas(●), raíz(■) y nódulos (▲) de plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

consistente con el concepto de que la fijación de nitrógeno depende precisamente del fotosintato como fuente de energía (Fishbeck y Phillips, 1982; Boller y Heichel, 1983).

Actividad nitrato reductasa.

El estudio de la actividad nitrato reductasa en hoja, raíz y nódulos de alfalfa, queda reflejado en la figura 37 (tablas CXC, CXCI y CXCI del "addendum"). Como cabía esperar el nivel de actividad nitrato reductasa en hoja disminuye a medida que el nitrógeno en forma de nitrato disminuye en el medio de cultivo, pero sólo hasta un determinado nivel de nitratos (Tratamiento 3) manteniéndose constante después. Se pone de manifiesto otra vez que la actividad nitrato reductasa no es proporcional al nivel de nitratos en la solución de cultivo, sino que depende de un adecuado equilibrio entre los aniones $\text{NO}_3^- / \text{SO}_4^-$, que probablemente se da en los tratamientos 4 y 5, en este tipo de experimentos.

La actividad nitrato reductasa ha sido estimada como el potencial de una planta para convertir el nitrógeno nítrico, en formas reducidas (Beevers y Hageman, 1980). La actividad enzimática en hojas de alfalfa no incrementa con la 2ª y 3ª dosis de nitrógeno como cabría esperar (Tratamientos 4 y 3 respectivamente) incluso presentan una disminución estadísticamente significativa, respecto al tratamiento con 1 dosis de nitrógeno (Tratamiento 5). Sin embargo, puesto que el contenido de nitratos (figura 39) en estos tratamientos es bastante similar, llevaría a pensar que el tratamiento 5 posee una nitrato reductasa más eficiente en la asimilación de nitratos, por tanto tiene más nitrógeno reducido por unidad de actividad nitrato reductasa (figura 38). Lo que podría sugerir que otros factores afectan la actividad nitrato reductasa (Friedrich *et al.*, 1977). Radin (1977) encontró que a medida que existe más nitrógeno en el medio radical, como nutriente, no aumenta el contenido de éste en

la parte aérea sino que se transporta a las raíces donde se acumula, hecho no detectado en estos resultados ya que el nivel de nitrógeno en la raíz es prácticamente constante en casi todos los tratamientos ensayados.

La actividad nitrato reductasa en raíz de alfalfa es despreciable, aspecto ya constatado en otros tipos de experimentos, mostrando un comportamiento semejante al descrito en hojas, es decir la actividad de la enzima decae a medida que el nivel de nitratos disminuye en el medio radical. Breteler y Nissen (1982) han informado que la nitrato reductasa radical de judías no se afectaba por el nitrato exógeno, indicando que la absorción de nitratos no estaba acoplada a la nitrato reductasa radical al menos a altas concentraciones. Este hecho se pone de manifiesto en alfalfa para un amplio rango de concentraciones de nitratos en la solución de cultivo.

La localización de la reducción de nitratos en alfalfa, es bastante similar a la observada en Trifolium, ya que transporta al 80 % del nitrato aplicado a los tallos y hojas (Pate, 1973). Ello es importante porque las plantas noduladas que reducen los nitratos en las hojas pueden usar el fotosintato más eficientemente que las que los reducen en la raíz (Atkins et al., 1979).

La actividad nitrato reductasa de los nódulos alcanza valores muy apreciables. Se ha encontrado una relación inversa entre la actividad enzimática detectada en hojas y en nódulos. Hecho ya constatado en otros experimentos y no descrito en bibliografía.

La nitrato reductasa ha sido detectada en nódulos de soja (Rigaud et al., 1973), de guisante (Chen y Phillips, 1977) y de alfalfa (Aparicio Tejo y Sánchez Díaz, 1982). La nitrato reductasa en nódulos de soja se encontró correlacionada con la fijación de nitrógeno. Vance et al. (1979) hallaron que esta actividad en alfalfa se inicia simultánea -

mente con el declive de la reducción de acetileno, por tanto estaría inversamente asociada con ésta. En este trabajo no se ha encontrado este tipo de correlación entre ambas actividades. Estas discrepancias asociadas a la fijación de nitrógeno pueden ser atribuidas al status fisiológico del sistema. Broughton et al. (1978) informaron que el incremento de actividad nitrato reductasa, puede reflejar un cambio en la regulación del metabolismo del nitrógeno en los nódulos, más bien que a la inducción de esta actividad por los nitratos.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la nitrato reductasa de nódulos no es un enzima inducible como la de hojas o raíz sino constitutiva (Timpo y Neyra, 1983). Por tanto estas diferencias existentes en las propiedades bioquímicas, distribución, localización y nivel de actividad enzimática, merecen una más intensa investigación.

La relación inversa observada entre la actividad reductora de nitratos en hojas y nódulos y el nivel de nitrógeno en la parte aérea, que va aumentando a medida que disminuye el contenido de nitratos en el medio radical, obliga a pensar que la nitrato reductasa del nódulo contribuye potencialmente al nitrógeno reducido en la planta. Esto estaría apoyado por varios hechos : a) La actividad enzimática en raíces de alfalfa es despreciable, siendo semejantes los resultados obtenidos por Randall et al. (1978) en soja; b) La actividad nitrato reductasa en nódulos es bastante apreciable incluso cuando los niveles de nitratos suministrados son bajos; c) Los nódulos incorporan nitrógeno procedente de los nitratos del medio, comprobado con nitrógeno marcado (Vance y Heichel, 1981), utilizando su nitrato reductasa.

En alfalfa podemos concluir que la actividad nitrato reductasa está presente en hoja, raíz y nódulos siendo el ranking de actividad : hojas > nódulos > raíz. Resultados concordantes con los de Vance y Heichel (1981).

TABLA 44.- Contenido en azúcares totales solubles y reductores, expresado en mg.g⁻¹ de hojas, tallos y raíces de plantas de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimentos C.

TRATAMIENTOS	AZUCARES TOTALES SOLUBLES			AZUCARES REDUCTORES			
	HOJA	TALLO	RAIZ	HOJA	TALLO	RAIZ	
1	\bar{X}	8,21	7,78	8,03	3,71	2,26	3,06
	%	77	97	126	91	61	126
2	\bar{X}	7,47	7,99	6,33	3,63	2,80	0,71
	%	70	99	99	89	76	30
3	\bar{X}	8,39	8,25	6,75	3,82	3,55	1,84
	%	79	103	105	94	96	76
4	\bar{X}	9,00	8,59	6,80	3,99	3,91	2,14
	%	84	107	102	97	106	88
5	\bar{X}	8,69	8,20	6,07	3,72	3,83	1,95
	%	82	102	95	91	104	80
6	\bar{X}	10,66	8,02	6,39	4,09	3,69	2,43
		100	100	100	100	100	100
Probabilidad		0,001	0,05	0,01	0,001	0,001	0,001
	0,05	1,107	0,832	0,974	0,299	0,418	0,307
MDS	0,01	1,513	1,137	1,332	0,409	0,571	0,419
	0,001	2,066	1,554	1,819	0,359	0,780	0,573

La nitrato reductasa puede tener una función asimiladora (suministra una fuente de nitrógeno para el crecimiento) o desasimiladora (acepta electrones en la respiración anaerobia). No está muy claro si la reductasa de los nódulos es asimiladora o desasimiladora (Rigaud et al., 1973; Bergersen, 1974). Los datos de este trabajo sugieren que la nitrato reductasa de los nódulos puede suministrar a la planta una fuente de nitrógeno cuando no es reducido en la hoja o puede actuar de fuente de nitrógeno alternativa, cuando la actividad nitrogenasa disminuye, aunque esto no niega la posibilidad de que la nitrato reductasa del nódulo pueda ser desasimilatoria y funcionar como aceptara de electrones en la senescencia del nódulo.

Azúcares totales solubles y reductores.

Los datos referentes a azúcares totales solubles y reductores determinados en raíz, tallo y hoja de alfalfa, se exponen en la tabla 44 que es una tabla resumen de un grupo de 6, comprendidas entre la CLXXX a la CLXXXV del "addendum". Los azúcares totales solubles en hojas y tallo parecen poco afectados por niveles de nitratos aplicados. En todos los tratamientos se alcanzan valores inferiores al testigo. Se podría pensar que las reservas son menores en las plantas con mayor crecimiento. También se puede intuir que el nitrógeno fijado simbióticamente contribuye a mantener un adecuado metabolismo carbonado en aquellos tratamientos con menores niveles de nitratos en la solución. De hecho, las plantas con niveles bajos de nitrógeno, en el medio, alcanzan un desarrollo igual (o mayor) que el alcanzado por las plantas con altos niveles de nitrógeno. La acumulación de materia seca en leguminosas, incrementa significativamente con la aplicación de nitrógeno combinado (Pankhurst y Jones, 1979; Dean y Clark, 1980). Sugiriendo que la fijación simbiótica de nitrógeno, probablemente deja de suministrar todos los requerimientos de nitrógeno para el óptimo crecimiento.

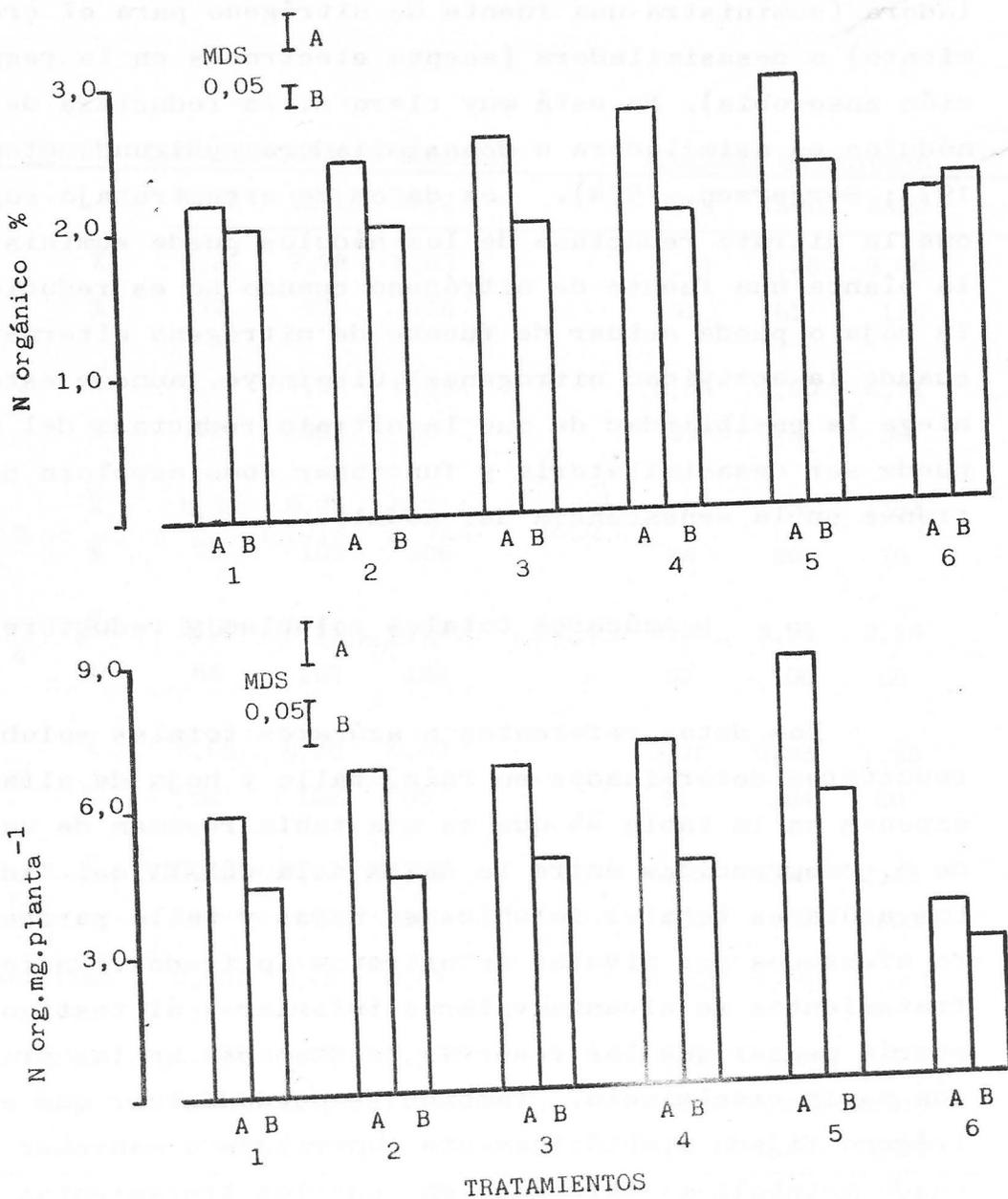


Fig. 38.- Contenido en nitrógeno, en % (Diagrama superior) y mg.planta⁻¹ (Diagrama inferior), en plantas de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Parte aérea (A) y raíz (B). Experimentos tipo C.

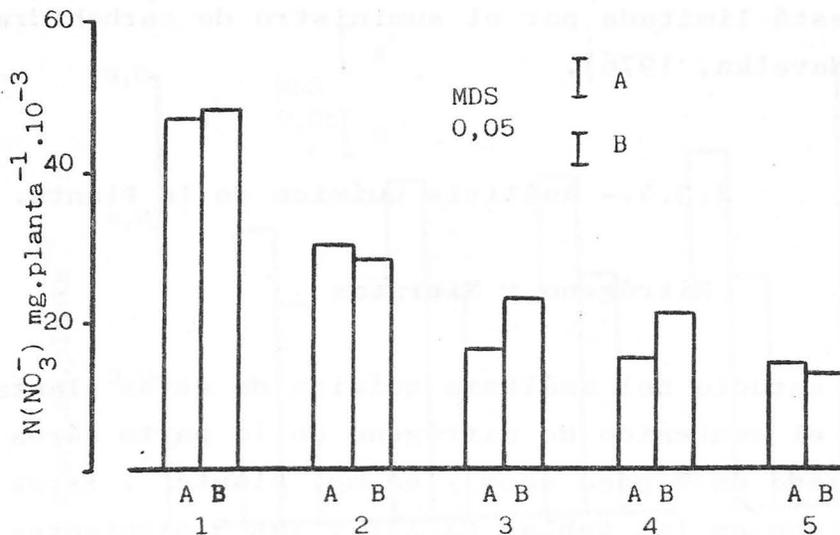
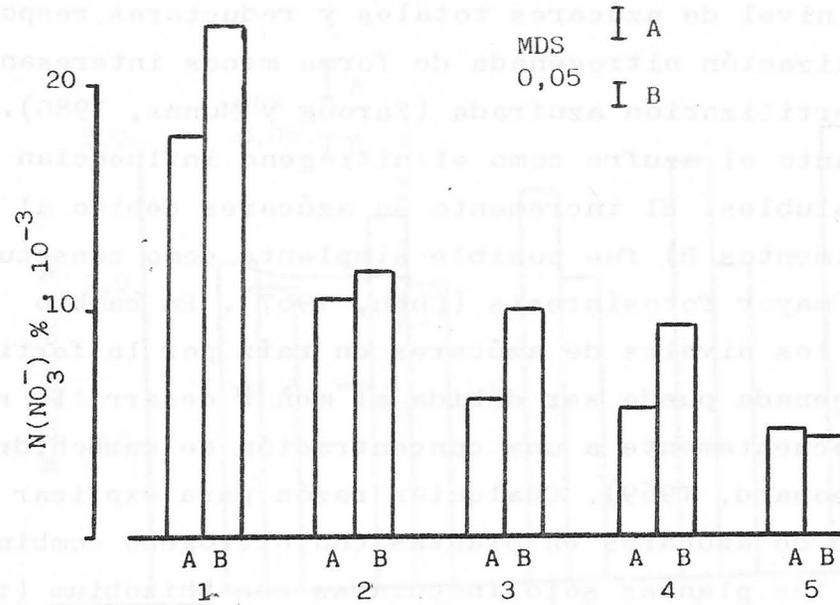
El nivel de azúcares totales y reductores responde a la fertilización nitrogenada de forma menos interesante que a la fertilización azufrada (Zaroug y Munns, 1980). Sin embargo, tanto el azufre como el nitrógeno influyen los azúcares solubles. El incremento en azúcares debido al azufre (experimentos B) fue posible simplemente como consecuencia de una mayor fotosíntesis (Chen, 1967). En cambio el aumento de los niveles de azúcares en raíz por la fertilización nitrogenada puede ser debida al menor desarrollo radical y consecuentemente a una concentración de carbohidratos (Small y Leonard, 1969). Cualquier razón para explicar la disminución de azúcares en plantas con nitrógeno combinado, respecto a las plantas sólo inoculadas con Rhizobium (testigo), es consistente con la suposición de que la fijación de nitrógeno está limitada por el suministro de carbohidratos (Hardy y Havelka, 1976).

2.3.4.- Análisis Químico de la Planta.

Nitrógeno y Nitratos

El estudio del análisis químico de estas plantas se inicia con el contenido de nitrógeno en la parte aérea y raíz expresado en % peso seco y en mg. planta⁻¹. Estos datos se indican en las tablas CXCLII y las 3 siguientes, aunque de forma más clara se exponen en el diagrama de barras de la figura 38. A continuación de forma similar se muestra el contenido de nitrógeno en forma de nitratos, en la figura 39 y las tablas CXCVII, CXCVIII, CXCIX y CC. En el "adendum" se han incluido dos tablas que indican el contenido de nitrógeno total (orgánico e inorgánico) absorbido por la raíz y la parte aérea en cada uno de los tratamientos ensayados (tablas CCI y CCII).

Los diagramas anteriormente mencionados ponen en evidencia que el nitrógeno orgánico de la parte aérea dismi



TRATAMIENTOS

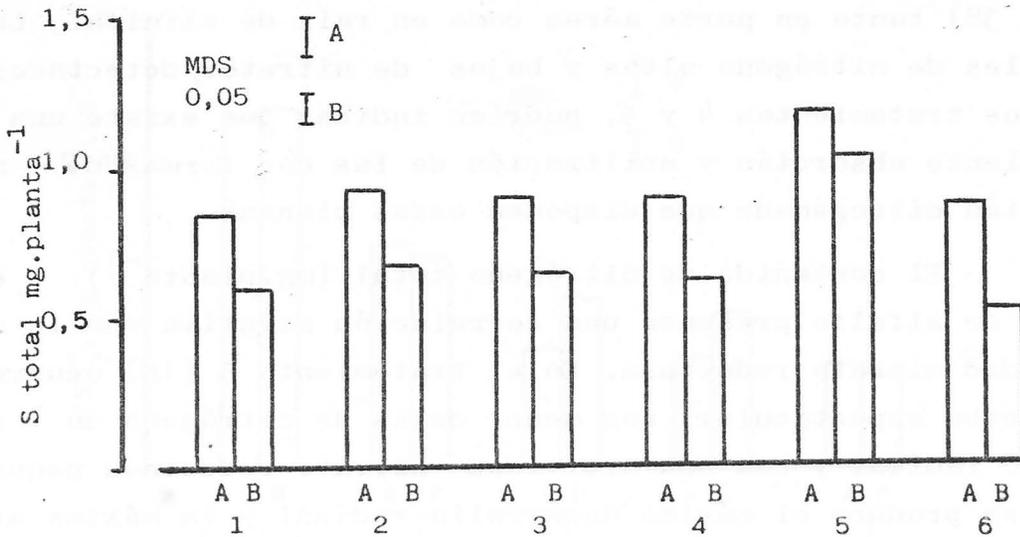
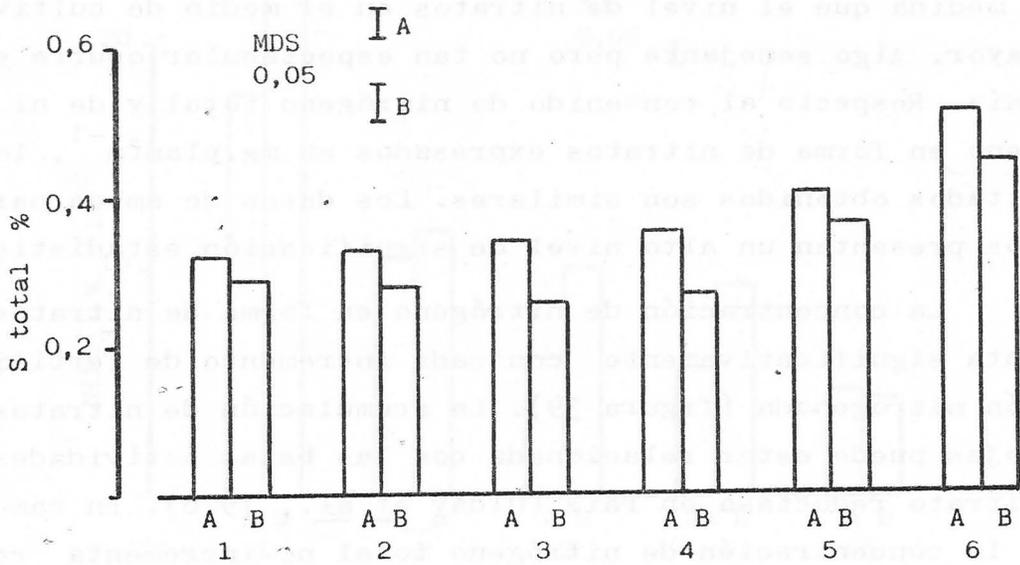
Fig. 39.- Contenido de nitrógeno en forma de nitratos, expresado en $\%$. 10^{-3} de peso seco (Diagrama superior) y en $mg \cdot planta^{-1} \cdot 10^{-3}$ (Diagrama inferior) en plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Parte aérea(A); raíz(B). Experimentos tipo C.

nuye y el contenido de nitrógeno en forma de nitratos aumenta a medida que el nivel de nitratos en el medio de cultivo es mayor. Algo semejante pero no tan espectacular ocurre en la raíz. Respecto al contenido de nitrógeno total y de nitrógeno en forma de nitratos expresados en mg.planta^{-1} , los resultados obtenidos son similares. Los datos de ambos parámetros presentan un alto nivel de significación estadística.

La concentración de nitrógeno en forma de nitratos aumenta significativamente con cada incremento de fertilización nitrogenada (figura 39). La acumulación de nitratos en hojas puede estar relacionada con las bajas actividades de nitrato reductasa en raíz (Olday et al., 1976). En cambio, la concentración de nitrógeno total no incrementa con las sucesivas adiciones de nitrógeno como fertilizante (figura 38) tanto en parte aérea como en raíz de alfalfa. Los niveles de nitrógeno altos y bajos de nitratos, detectados en los tratamientos 4 y 5, podrían indicar que existe una eficiente absorción y utilización de las dos formas de nutrición nitrogenada que disponen estas plantas.

El contenido de nitrógeno total (mg.planta^{-1}) en raíz de alfalfa presenta una correlación negativa con la actividad nitrato reductasa. En el tratamiento 5 (1N) ocurre un hecho espectacular, con menor dosis de nitrógeno en el medio radical y con una actividad nitrato reductasa pequeña, se produce el máximo desarrollo radical y la máxima acumulación de nitrógeno orgánico. Esto podría indicar que el ensayo "in vivo" no representa fielmente la reducción de nitratos "in situ" o bien que hay más fotosintato disponible para las raíces, como lo demuestra el hecho de ser el tratamiento con más clorofila (tabla 43) y mayor número de hojas (tabla 39).

Se ha encontrado que en alfalfa, los nitratos se acumulan en raíz y en hoja en cantidades bastante semejantes, quizá más en raíz (experimentos A y C), sin embargo Vance y Heichel (1981) indican que en alfalfa es mayor el acúmulo de nitratos en hojas.



TRATAMIENTOS

Fig. 40.- Contenido de azufre total, expresado en % de peso seco (Diagrama superior) y en mg.planta⁻¹ (Diagrama inferior), en plantas de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Parte aérea (A); raíz(B). Experimentos tipo C.

La acumulación de nitratos en plantas que crecen con distintos niveles de nitrógeno sugiere que la asimilación no está en consonancia con la velocidad de absorción. Los valores de nitratos elevados en la parte aérea de las leguminosas forrajeras pueden ser muy arriesgados para el ganado y por tanto peligrosos ya que los nitratos se convierten en nitritos en el rumen del vacuno por la microflora específica. Los valores letales totales son de 0.6 a 3,5 % de nitrógeno como nitrato en distintas plantas (Wright y Davison, 1964). En este trabajo no se han alcanzado esos niveles.

En raíz, se observa una correlación positiva entre nitrato reductasa y contenido de nitrógeno en forma de nitrato, sin embargo no se encuentra este tipo de correlación con el nitrógeno total o con el protéico como lo describen algunos autores (Dalling et al., 1975). Hay que tener en cuenta que utilizan ensayos "in vitro" para la determinación de la actividad nitrato reductasa que no refleja verdaderamente la actividad "in vivo" (Hewitt, 1975). Reed y Hageman (1980) encuentran correlación estadísticamente significativa entre actividad nitrato reductasa y acumulación de nitratos.

Azufre y Sulfatos.

En la figura 40 se expone el contenido de azufre total en parte aérea y raíz de alfalfa, y el contenido de azufre en forma de sulfatos en la figura 41. Estos dos diagramas de barras han sido construidos con los datos que se detallan en 8 tablas del "addendum", las incluidas desde la CCIII a la CCX. Además para completar el estudio del azufre contenido en las plantas de alfalfa, se han incluido las 4 tablas siguientes del "addendum", que exponen el contenido de azufre orgánico en parte aérea y raíz, expresado en % y en mg. planta⁻¹.

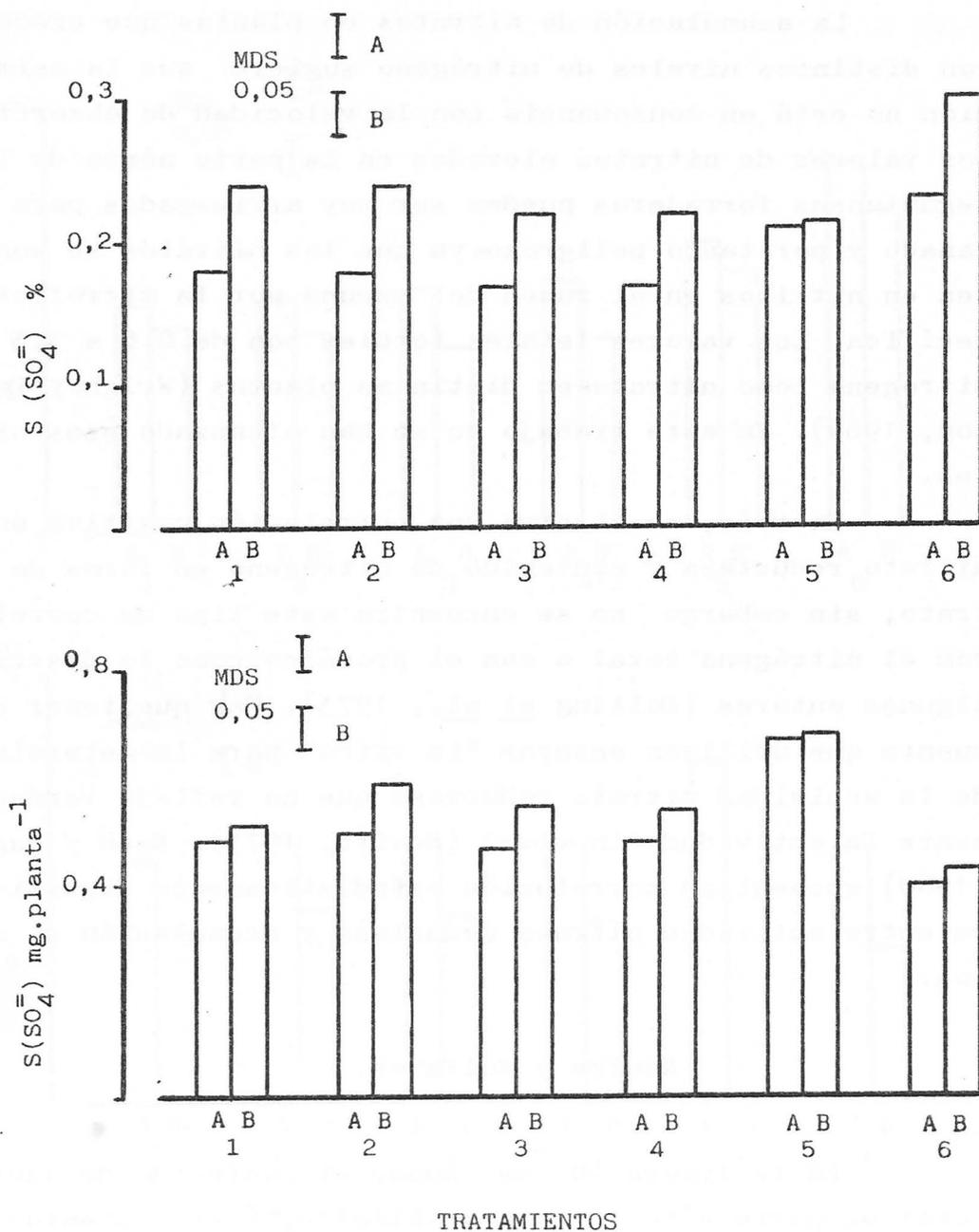


Fig. 41.- Contenido de azufre en forma de sulfatos expresado en % de peso seco (Diagrama superior) y en mg.planta^{-1} (Diagrama inferior) en planta de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Pare aérea (A); raíz(B). Experimentos tipo C.

El nitrógeno del medio radical influye débilmente en la absorción de azufre, aumentándose el nivel de azufre en la parte aérea de alfalfa a medida que existe menos nitrógeno en la solución de cultivo. Sin embargo, tanto en hoja como en raíz los valores de azufre que se alcanzan son inferiores al testigo debido a que éste utiliza una solución sin nitratos y los cationes utilizan como anión acompañante al sulfato, y además el nivel de sulfato en el testigo es bastante elevado. No obstante, si se tiene en cuenta el azufre total absorbido por la planta se alcanzan valores superiores o iguales al testigo tanto en raíz como en parte aérea (figura 40 y 41, diagramas inferiores).

Relación N/S en planta.

La relación N/S en planta ha sido expuesta en la tabla 45 obteniéndose valores muy similares entre los tratamientos realizados.

Las necesidades de azufre para un cultivo pueden ser estudiadas mejor, utilizando la relación N/S en planta (Martel y Zizka, 1977). En estos experimentos se detecta, observando la tabla anteriormente mencionada, que las variaciones de la relación N/S están muy relacionadas con las variaciones de azufre. La relación N/S en planta se mantiene prácticamente constante en los tratamientos 1, 2, 3, 4 y muestra un valor límite a partir del cual se entraría en la zona de deficiencia de azufre. En cambio, la relación N/S que alcanza el tratamiento 5 indica una acusada deficiencia de azufre en los tejidos de la planta. Teniendo en cuenta que el nivel de azufre adicionado en todos los tratamientos es constante, se podría decir que la fertilización nitrogenada mejora la utilización del azufre.

Tabla 45.- Resultados relativos a la relación N/S en parte aérea de plantas de alfalfa para cada tratamiento realizado. Experimentos tipo C.

Valores absolutos

Repeticiones	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
1	18,92	13,63	12,74	14,57	20,36	7,86
2	15,15	16,35	14,80	17,02	24,34	7,23
3	16,03	14,64	16,40	15,02	19,33	7,73
4	14,64	17,49	15,78	13,68	22,89	7,91
Media	16,18	15,53	14,93	15,07	21,85	7,68
Desv. típica	1,65	1,49	1,38	1,22	1,91	0,27
% testigo	210,58	202,05	194,29	196,12	284,36	100,00

Análisis de la varianza

Fv	G1	Sc	Mc	Fc	Prob.
Tratamientos	5	407,8289	81,5657	30,26	0,001
Error	18	48,5076	2,6948	0,00	
Total	23	456,3366	0,0000	0,00	

M.D.S.

Probabilidad	0,05	0,01	0,001
Tratamientos	2,437	3,331	4,550

Otros macronutrientes : Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio.

A continuación se incluyen dos figuras 42 y 43. En ellas se indica el contenido de fósforo, potasio, calcio y magnesio en parte aérea y raíz. Estas figuras se han elaborado tomando los valores medios de las 16 tablas del "addendum" comprendidas entre la CCXV a la CCXXX. Se observa que existen procesos de interacción entre el nitrógeno del medio y la absorción de los elementos esenciales estudiados. Esta interacción es sinérgica con el magnesio y calcio tanto en parte aérea como en raíz y antagónica con el fósforo y potasio adsorbido por las plantas.

El nitrato sensiblemente disminuye los niveles de FOSFORO en parte aérea y raíz como se observa en la figura 42, y lo mismo ocurre con los niveles de sulfato crecientes en el medio radical (Experimentos B, figura 33) tal como describen Zaroug y Munns (1980). Esto puede indicar algún efecto antagónico, en el proceso de absorción, entre aniones tal como describieron Ligeró et al. (1981). El efecto antagonista entre el azufre y el fósforo ha sido también descrito por Aulakh y Pasricha (1977).

Otro aspecto interesante observado en este trabajo ha sido la asociación entre elevados niveles de fósforo en brote, 0,69 % y en raíz, 0,96 % y de biomasa nodular. Esto sugiere que el fósforo en la planta actúa estimulando la nodulación y el crecimiento del nódulo. Resultados semejantes han sido descritos por Van Kessel y Roscoski (1981).

El POTASIO no cabe duda que favorece el proceso de fijación de nitrógeno, pues coincide el máximo contenido de este elemento en raíz (2,17 %) y brote con la máxima actividad nitrogenasa, al igual que ocurre en los experimentos tipo B, 2,17 % (figura 33), tal como indica Barte (1982). Esta cita sugiere que el potasio incrementó el nivel de carbohidratos en los nódulos que como se ha demostrado en repe

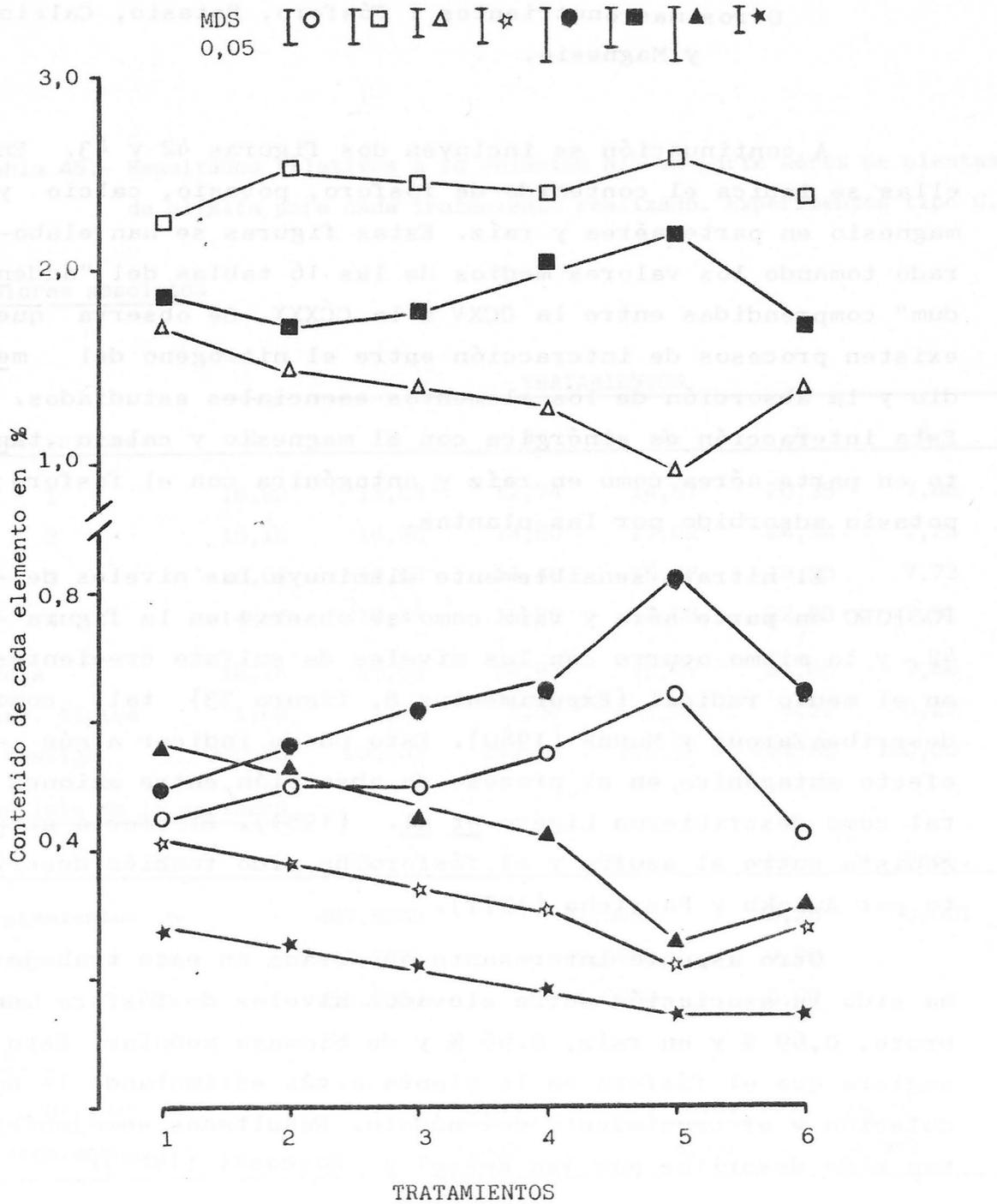


Fig. 42.- Contenido de P(O), K(□), Ca(Δ) y Mg(☆), en parte aérea (Símbolos en blanco) y en raíz (Símbolos en negro), de plantas de alfalfa para cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo C.

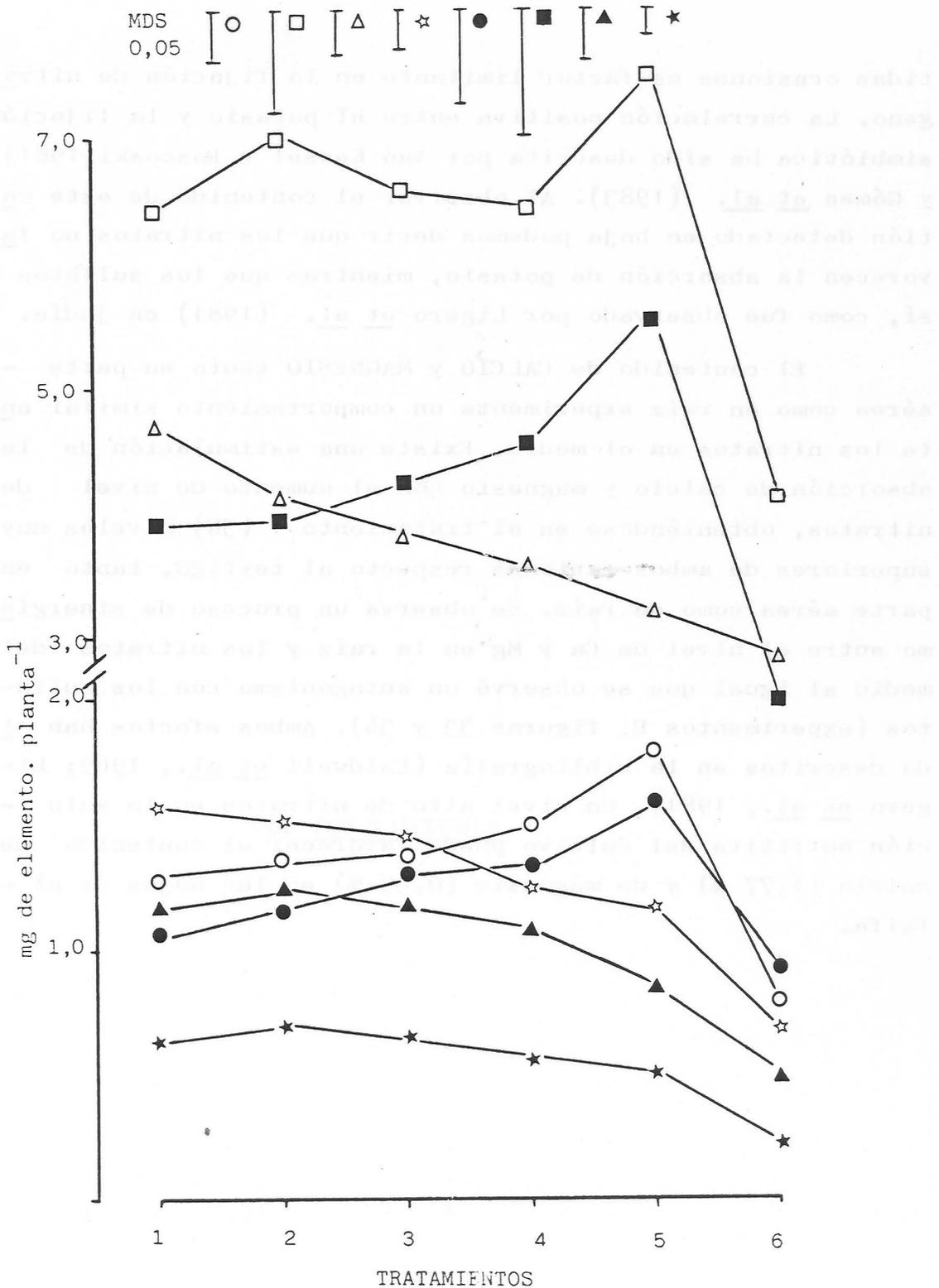


Fig. 43.- Contenido de P(O), K(□), Ca(Δ) y Mg(☆) en parte aérea (Símbolos en blanco) y en raíz (Símbolos en negro) de plantas - de alfalfa en cada tratamiento ensayado. Experimentos tipo C.

tidas ocasiones es factor limitante en la fijación de nitrógeno. La correlación positiva entre el potasio y la fijación simbiótica ha sido descrita por Van Kessel y Roscoski (1981) y Gómez et al. (1983). Al observar el contenido de este ca tión detectado en hoja podemos decir que los nitratos no fa vorecen la absorción de potasio, mientras que los sulfatos sí, como fue observado por Ligeró et al. (1981) en judía.

El contenido de CALCIO y MAGNESIO tanto en parte - aérea como en raíz experimenta un comportamiento similar an te los nitratos en el medio. Existe una estimulación de la absorción de calcio y magnesio con el aumento de nivel de nitratos, obteniéndose en el tratamiento 1 (5N) niveles muy superiores de ambos cationes respecto al testigo, tanto en parte aérea como en raíz. Se observa un proceso de sinergis mo entre el nivel de Ca y Mg en la raíz y los nitratos del medio al igual que se observó un antagonismo con los sulfatos (experimentos B, figuras 33 y 34). Ambos efectos han si do descritos en la bibliografía (Caldwell et al., 1969; Ligeró et al., 1981). Un nivel alto de nitratos en la solu - ción nutritiva del cultivo puede favorecer el contenido de calcio (1,77 %) y de magnesio (0,59 %) en las hojas de al - falfa.

La planta responde a las condiciones de cultivo de manera favorable, obteniendo un rendimiento de 10 toneladas por hectárea, lo que representa un aumento del 20% con respecto a la planta control.

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de la planta controlada es una alternativa viable para mejorar el rendimiento de los cultivos, especialmente en condiciones de cultivo de alta densidad.

VI. CONCLUSIONES

El uso de la planta controlada es una alternativa viable para mejorar el rendimiento de los cultivos, especialmente en condiciones de cultivo de alta densidad.

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de la planta controlada es una alternativa viable para mejorar el rendimiento de los cultivos, especialmente en condiciones de cultivo de alta densidad.

- 1.- La planta responde a la inoculación bacteriana con una liberación de etileno que se interpreta como una reacción defensiva frente a la bacteria que es más intensa, en presencia de mayores niveles de nitrógeno combinado. Se puede considerar como una respuesta hormonal en la interacción microbio planta. El efecto inhibitorio de los nitratos sobre la nodulación está, por tanto, mediado por esta hormona vegetal.
- 2.- Las etapas morfogénicas claves del desarrollo del nódulo estarían precedidas por la liberación de etileno. Esta hormona puede ser considerada factor crítico del proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Etapas importantes de la simbiosis, como son el inicio de la formación del nódulo y el máximo nivel de actividad nitrógenasa coinciden con pulsaciones intensas de esta hormona vegetal.
- 3.- Todos los experimentos en cultivos hidropónicos en macetas han demostrado una correlación positiva significativa entre la actividad nitrógenasa específica de los nódulos y el contenido de leghemoglobina, independientemente de las variaciones en el medio radical. Por lo que apoya su consideración como un índice adecuado de la fijación de nitrógeno.
- 4.- La reducción o asimilación de nitratos en plantas de alfalfa ocurre principalmente en hoja, detectándose niveles despreciables de actividad nitrato reductasa en raíz. Esta actividad ha sido detectada en nódulos de raíces de alfalfa, contribuyendo potencialmente al "pool" de nitrógeno reducido de la planta.
La actividad nitrato reductasa en plantas de alfalfa no es proporcional a los niveles de nitratos en el medio, sino que depende por un lado, de un adecuado balance o equilibrio entre los nitratos y sulfatos existen-

tes y por otro, del nivel de actividad nitrato reductasa en los nódulos. Esto se deduce de la relación inversa que presentan los valores de la actividad enzimática, encontrada en hoja y nódulos, no descrita en bibliografía y que es independiente de las variaciones del medio de cultivo.

- 5.- No existe antagonismo, entre las dos formas de asimilar el nitrógeno en las leguminosas, con niveles medios y bajos de nitrógeno combinado. Hasta estos niveles ejercen un efecto positivo sobre la fijación de nitrógeno manteniéndose, además, adecuados niveles de reducción de nitratos, lo que se traduce en incrementos de cosecha.
- 6.- Los nitratos se acumulan más en la raíz de las plantas de alfalfa que en la parte aérea. Esta acumulación se mitiga con el azufre en el medio, al favorecerse la proteínosíntesis. También los sulfatos en la alfalfa, se acumulan, mayoritariamente, en la raíz, aunque su asimilación depende principalmente de los niveles de sulfato en el medio radical más que de su interacción con los nitratos. Esto indica que el metabolismo del nitrógeno es más dependiente de la interacción nitrógeno y azufre.
- 7.- Se ha observado en todos los experimentos y tratamientos una absorción máxima de potasio en las plantas de alfalfa que se correlaciona positivamente con la máxima fijación de nitrógeno. Hay por tanto, una baja absorción de potasio en altas concentraciones de nitratos en el medio de cultivo, además del correspondiente antagonismo en la absorción del fósforo y un sinergismo en la absorción de calcio y magnesio.

8.- La fertilización azufrada puede ejercer efectos sorprendentes en el metabolismo nitrogenado de las plantas de alfalfa determinando, incluso a pequeñas dosis, incrementos de cosechas similares a los obtenidos con niveles altos de nitrógeno combinado.

- ABELES, F.B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic Press, New York, ISBN 0-12 - 041450-3.
- ABELES, A.L. y ABELES, L.B. 1972. Biochemical pathway of stress-induced ethylene. *Plan Physiol*; 50, 496-498.
- ABELES, L.B.; BOSSHART, R.P.; FORRENCE, L.E. y HABIG, W.H. 1971. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol*; 47, 129-134.
- ADDISCOTT, T.M. 1977. Potassium in relation to transport of carbohydrate and ions in plants. *J. Soil Sci.*; 28, 554-563.
- AGUILAR, A.; ROMERO, L. y LACHICA, M. 1980. Determinación de nitratos en tejidos vegetales. 5th International Colloquium on the Control of Plant Nutrition. Castelfranco, Vento (Treviso).
- AHMED, J. y SPILLER, H. 1976. Purification and some properties of the nitrate reductase from Ankistrodesmus bra
vaii. *Plant Cell Physiol*, 17, 1-10.
- AKKERMANS, A.D.L. 1978. Root nodule symbiosis in non-leguminous nitrogen-fixing plants. En: Interactions between Non-Pathogenic soil Microorganisms and Plants. (Y.R. Docu
merges and S.V. Krupa, eds) pp. 335-372. Elsevier, Amsterdam.
- ALBERSHEIM, P. y ANDERSON-PROUTY, A.J. 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*; 26, 31-52.
- ALLEN, N.O. 1957. Experiments in soil bacteriology. Burgess Publishing Minneapolis. Minnesota.
- ALLEN, E.K. y ALLEN, O.N. 1961. Recent advances in Botany. Univ. Toronto. Press. pp. 585-588.
- ALLEN, E.K. y ALLEN, O.N. 1976. The nodulation profile of the genus Cassia. En: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants (P.S. Nutman, Ed.) IBP 7, pp. 113-122. Cambridge Univ. Press. London and New York.
- ALLISON, F.E. 1935. Carbohydrate supply as a primary factor in legume symbiosis. *Soil Sci.*, 39, 123-143.
- AMY, N.K.; GARRET, R.H. y ANDERSON, B.H. 1977. Reactions of the Neurospora crassa nitrate reductase with NAD(P)ana
logs. *Biochim. Biophys. Acta* ; 480, 83-93.
- ANDERSON, A.J. y SPENCER, D. 1950. Sulfur in nitrogen metabolism of legumes and non-legumes. *Aust. J. Agric. Res.* 3, 431-438.

- ANDERSON, J.M. y CORNIER, M.J. 1978. Calcium dependent regulator of NAD kinase in higher plants. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 84, 595-602.
- ANDERSON, J.W. 1980. Assimilation of inorganic sulfate into cysteine. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol. 5. pp. 203-223. Academic Press Inc.
- ANDREU, C.S. 1977. The effect of sulphur on the growth, sulphur and nitrogen concentrations, and critical sulphur concentrations of some tropical and temperate pasture legumes. *Aust. J. Agric. Res.*; 28, 807-820.
- ANSARI, A.Q. y BOWLING, D.J.F. 1972. Measurement of the transroot electrical potential of plants grown in soil. *New Phytol.* ; 71, 111-117.
- ANTOUN, H.; BORDELEAU, L.M.; PREVOST, D. y LACHANCE, R.A. 1980. Absence of a correlation between nitrate reductase and symbiotic nitrogen fixation efficiency in Rhizobium meliloti. *Can. J. Plant Sci.*; 60, 209-212.
- APARICIO-TEJO, P. y SANCHEZ-DIAZ, M. 1982. Nodule and leaf nitrate reductase and nitrogen fixation in Medicago sativa L. under water stress. *Plant Physiol.*, 69, 479-482.
- APPLEBY, C.A. 1969. Electron transport system of Rhizobium japonicum I. Haemoprotein P450 oter co-reactive pigments, cytochromes and oxidases in bacteroids from N₂-fixing root nodules. *Biochim. Biophys. Acta* 172, 71-78.
- APPLEBY, C.A. 1974. Leghemoglobin. En: *The Biology of Nitrogen Fixation*. (Quispel, A. ed.). p. 521. North Holland Amsterdam.
- APPLEBY, C.A.; BERGERSEN, F.J.; CHING, T.M.; GIBSON, A.B.; GRESSHOFF, P.M. y TRINICK, M.J. 1981. Cytochromes of rhizobia from Parasponia, pea and soybean nodules and from nitrogen fixing continuous cultures. En: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. (Edited by A.H. Gibson and W.E. Newton). p. 369. Australian Academy of Science, Canberra.
- APPLEBY, C.A.; TURNER, G.L. y MACNICOL, P.K. 1975. Involvement of oxyleghaemoglobin and cytochrome P450 in an efficient oxidative phosphorylation pathway which supports nitrogen fixation in Rhizobium. *Biochim. Biophys. Acta*, 387, 461-474.
- ARNON, D.I. 1937. Ammonium and nitrate nitrogen nutrition of barley at different seasons in relation to hydrogen-ion concentration, manganese, copper, and oxygen supply. *Soil Sci.*, 44, 91-120.

- ARORA, S.K. 1983. Chemistry and Biochemistry of Legumes. Edited by S.K. Arora. Edward Arnold. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi. 100. 001.
- ARORA, S.K. y LUTHRA, Y.P. 1970. Metabolism of sulphur containing amino acids in Phaseolus aureus. Zeit. Pflanzen und Biochem., 126, Heft. 2: 151-158.
- ARORA, S.K. y LUTHRA, Y.P. 1971. Nitrogen metabolism of leaves during growth of Phaseolus aureus L. as affected by S, P, and N application. Plant and Soil, 34, 283-291.
- ARP, D.J. y BURRIS, R.H. 1982. Isotope exchange and discrimination by the H₂-oxidizing hydrogenase from soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta, 700, 5-15.
- ASLAM, M. y OAKS, A. 1975. Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. Plant Physiol, 56, 634-639.
- ASLAM, M.; OAKS, A. y HUFFAKER, R.C. 1976. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. Plant Physiol., 58, 588.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S. y LAYZELL, D.B. 1979. Assimilation and transport of nitrogen in non-nodulated (NO₃-grown) Lupinus albus, L. Plant Physiol., 64, 1072-82.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S. y SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism : Key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant Physiol., 56, 807-812.
- AULAKH, M.S.; DEV, G. y ARORA, B.R. 1976. Effect of sulphur fertilization on the nitrogen-sulphur relationships in alfalfa (Medicago sativa, L. Pers.). Plant and Soil, 45 75-80.
- AULAKH, M.S. y PASRICHA, N.S. 1977. Interaction effect of sulphur and phosphorus on growth and nutrient content of moong (Phaseolus aureus, L.). Plant Soil, 47, 341-350.
- AULAKH, M.S. y DEV, G. 1978. Interaction effect of calcium and sulphur on the growth and nutrient composition of alfalfa (Medicago sativa, L. Pers.). using ³⁵S. Plant and Soil, 50, 125-134.
- AWONAIKE, K.O.; LEA, P.W.; DAY, J.M.; ROUGHLEY, R.J. y MIFLIN, B.J. 1980. Effects of combined nitrogen on nodulation and growth of Phaseolus vulgaris. Expl. Agric. 16, 303-311.

- BAL, A.K.; SHANTHARAM, S. y RATNAM, S. 1978. Ultrastructure of *Rhizobium japonicum* in relation to its attachment to root hairs. *J. Bacteriol.*; 133, 1393-1400.
- BARAKHTENOVA, L.A. 1980. Dynamics of sulphur dioxide absorption and its effects on the intensity of photosynthesis in C₃ and C₄ plants. *Gazoustoich. Rast.*, 86-96.
- BARKER, A.V.; MAYNARD, D.N. y LACHMAN, W.H. 1966. Nitrate accumulation in vegetables I. Spinach grown in upland soil. *Soil Sci.*, 103, 319-327.
- BARKER, A.V.; PECK, N.H. y McDONAL, G.E. 1971. Nitrate accumulation in vegetables I. Spinach grown in upland soils. *Agron. J.*; 63, 126-129.
- BARKER, A.V. y MAYNARD, D.N. 1972. Cation and nitrate accumulation in pea and cucumber plants as influenced by nitrogen nutrition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*; 97, 27-30.
- BERKER, A.V.; MAYNARD, D.N. y MILLS, H.A. 1974. Variations in nitrate accumulation among spinach cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*; 99, 132-134.
- BARTA, A.L. 1982. Response of symbiotic N₂ fixation and assimilate partitioning to K supply in alfalfa. *Crop Science*, 22, 89-92.
- BARTHOLOMEW, W.V.; NELSON, L.B. y WERMAN, C.H. 1950. The use of the nitrogen isotope ¹⁵N in field studies with oats. *Agron. J.*, 42, 100.
- BASHIROVA, N.F.; MELIK-SARKISYAN, S.S. y KRETOVICH, W.L. 1978. The effect of enzymatic reduction of leghaemoglobin and myoglobin on the nitrogen fixing activity of *Rhizobium lupini* bacteroids. *Physiol. Rast. Akad. Nauk SSSR.*, 25, 720-725.
- BATES, T.E. 1971. Factors affecting critical nutrient concentrations in plants and their evaluation: a review. *Soil Sci.*; 112, 116-130.
- BAUER, W.D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. *Ann. Rev. Plant Physiol.*; 32, 407-49.
- BAUER, W.D. y BHUVANESWARI, T.V. 1979. The possible role of lectins in legume-Rhizobium symbiosis and other plant-microorganism interactions. En: *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation*. New Delhi. Oxford and IBH, 344-79.
- BAUER, W.D.; BHUVANESWARI, T.V. y BHAGWAT, A.A. 1980. Transient susceptibility of root cells in five common legumes to infection by rhizobia. *Plant Physiol. Abstr.* 748 p 136.

- BECKING, J.M. 1974. Nitrogen, fixing bacteria of the genus Beijerinckia. En : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (R.E. Buchanan and N.E. Gibson, eds), pp. 701-708 Williams and Wilkins. Baltimore.
- BECKING, J.H. 1977. Actinomycete symbiosis in non-legumes. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation (R.W.F. Hardy & W.S. Silver eds.) Section III, pp. 185-275. Willey, New York.
- BEDMAR, E.J. y OLIVARES, J. 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living Rhizobium meliloti. Current Microbiology ; 2, 11-14.
- BEDMAR, E.J. y OLIVARES, J. 1980. Effect of chemical inhibitors of photorespiration on nitrogenase activity in nodulated alfalfa plants. Planta, 150, 299-302.
- BEDMAR, E.J. y OLIVARES, J. 1982. Limitaciones de la fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia. Febrero nº 65, 26-34.
- BEDNARSKI, M.A. y REPORTER, M. 1978. Expression of rhizobial nitrogenase : Influence of plant cell -conditioned medium. Appl. Env. Microbiol.; 36, 115-120.
- BEESON, K.C. 1941. USDA. Misc. Publ. 369. Citado por SHUKLA, U.C.; DIXIT, M.L. y ARORA, S.K. En: Chemistry and biochemistry of legumes. Edited by S.K. ARORA, Edward Arnold (Publc.) 1983, pag. 259, USDA Misc. Publ. 369.
- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen Metabolism in Plants. Arnold, London.
- BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 495-522.
- BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. 1980. Nitrate and nitrite reduction. En: The Biochemistry of Plants. Vol. 5. Academic Press Inc. pp. 115-168.
- BENEMANN, J.R.; YOCH, D.C.; VALENTINE, R.C. y ARNON, D.I. 1971. Electron transport system in nitrogen fixation by Azotobacter. III Requiriments for NADPH-supported nitrogenase activity. Biochim. Biophys. Acta, 226, 205 - 212.
- BENNETT, A.C. 1971. Toxic effects of aqueous ammonia, copper, zinc, lead, boron and manganese on root growth.

- En: E.W. Carson (ed.) The plant root and its environment. Univ. of Virginia Press, Charlottesville.
- BENNETT, A.C. 1974. Toxic effects of aqueous ammonia, copper, zinc, lead, boron, and manganese on root growth. En: Carson, E.W. ed. The Plant Root and its Environment p. 669-683. Univ. of Virginia. Charlottesville.
- BERGERSEN, F.J. 1974. Formation and function of bacteroids. En: The Biology of Nitrogen Fixation (A. Quispel, ed.). pp. 473-498. North-Holland. Amsterdam.
- BERGERSEN, F.J. 1977. Physiological chemistry of dinitrogen fixation by legumes. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation. (R.W.F. Hardy and W.S. Silver, eds.). Section III. pp. 519-555. Wiley. New York.
- BERGERSEN, F.J. 1978. Physiology of the legume symbiosis. En: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Ed. Y.R. Dommergues y S.V. Krupa. Elsevier Publ. Amsterdam. 305-334.
- BERGERSEN, F.J. 1982. Root nodules of legumes : Structure - and functions. Research studies press. Editorial office. 58B Station Road, Letchworth, Herts. SG8 3BE. England.
- BERGERSEN, F.J. y APPLEBY, C.A. 1981. Leghaemoglobin within bacteroid-enclosing membrane envelopes from soybean root nodules. *Planta* ; 152, 534-543.
- BERGERSEN, F.J. y GIBSON, A.M. 1978. Nitrogen fixation by Rhizobium spp. in laboratory culture media. En: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. (J. Döbereiner, R.H. Burris and A. Hollaender, Eds.). Basic Life Sciences, Vol. 10. pp. 263-274. Plenum. New York.
- BERGERSEN, F.J. y GOODCHILD, D.J. 1973a. Aeration pathway in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26, 729-740.
- BERGERSEN, F.J. y GOODCHILD, D.J. 1973 b. Cellular location and concentration of leghaemoglobin in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26, 741-756.
- BERGERSEN, F.J. y TURNER, G.L. 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochem. Biophys. Acta*, 141, 507-515.

- BERGERSEN, F.J. y TURNER, G.L. 1976. The role of O₂-limitation in control of nitrogenase in continuous cultures of Rhizobium sp. Biochem. Biophys. Res Commun.; 73, 524-531.
- BERGERSEN, F.J. y TURNER, G.L. 1978. Activity of nitrogenase and glutamine synthetase in relation to availability of oxygen in continuous cultures of a strain of cow pea Rhizobium sp. supplied with excess ammonium. Biochim. Biophys. Acta, 538, 406-416.
- BERINGER, J.E. 1976 a. The demonstration of conjugation in Rhizobium leguminosarum. En : Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. (P.S. Nutman, ed.). IBP 7 pp. 91-97. Cambridge Univ. Press. London and New York,
- BERINGER, J.E. 1976 b. Plasmid transfer in Rhizobium. En : Proceedings of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation (W.E. Newton and C.J. Nyman, eds.). Vol.2. p.358-366. Washington State Univ.Press. Pullman.
- BERINGER, J.E.; HOGGAN, S.A. y JOHNSTON, A.W.B. 1978. Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R plasmid-mediated recombination. J. Gen. Microbiol., 104 201-207.
- BEROARD-CERNING, J. y FILIATRE, A. 1977. Characterization and distribution of soluble and insoluble carbohydrate in legume seeds horse beans, peas, lupines, in protein quality from leguminous crops. Comision de la CEE Bruselas.
- BERTAGNOLLI, B.L. y WEDDING; R.T. 1977. Purification and initial kinetic characterization of different forms of O-Acetylserine sulphhydrylase from seedling of two species of Phaseolus. Plant Physiol., 60, 115-121.
- BETHGE, O. 1954. An apparatus for the wet ashing of organic matter. Anal. Chem. Acta, 10, 317-320.
- BETHLENFALVAY, G.J. y PHILLIPS, D.A. 1978. Interactions between symbiotic nitrogen fixation combined-N application, and photosynthesis in Pisum sativum. Physiologia Plantarum, 42, 119-123.
- BETHLENFALVAY, G.J.; ABU-SHAKRA, S.S. y PHILLIPS, D.A. 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, 127-30.

- BEYER, E.M. y BLOMSTROM, D.C. 1979. Ethylene metabolism - and its possible physiological role in plants. En : Plant Growth Sustances. SKOOG, F. Ed.
- BHANGOO, M.S. y ALBRITTON, D.J. 1976. Nodulating and non - nodulating isolines response to applied nitrogen. Agron. J. ; 68, 642-645.
- BHUVANESWARI, T.V. y BAUER, W.D. 1978. Role of lectins in plant-microorganism interactions. III. Binding of soybean lectin to root cultured rhizobia. Plant Physiol. 62, 71-74.
- BHUVANESWARI, T.V.; PUEPPKE, S.G. y BAUER, W.D. 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Bin ding of soybean lectin to rhizobia. Plant Physiol.; 60, 486-91.
- BHUVANESWARI, T.V.; TURGEON, G. y BAUER, W.D. 1980. Early stages in the infection of soybean (Glycine max L. Merr) by Rhizobium japonicum. I. Localization of infec tible root cells. Plant Physiol.; 66, 1027-31.
- BIRECKA, H.; BRIBER, K.A. y CATALFAMO, J.L. 1973. Comparati ve studies on tobacco pith and sweet potato root iso peroxidases in relation to injury, indoleacetic acid and ethylene effects. Plant Physiol., 52, 43-49.
- BISSELING, T.; VAN DEN BOS, R.C.; VAN KAMMEN, A.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DUIJN, P. y HOUWERS, A. 1977. Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding browth-cultured Rhizobium-bacteria. J. Gen. Microbiol., 101, 79-84.
- BISSELING, T.; VAN DEN BOS, R.C. y VAN KAMMEN, A. 1978. The effect of ammonius nitrate on the synthesis of nitro - genase and the concentration of leghaemoglobin in pea root nodules induced by Rhizobium leguminosarum. Biochim. Biophys. Acta 539, 1-11.
- BLANC, D. y MORISOT, A. 1980. Les nitrates d'origine agricole: leur accumulation dans la plante, leur effet sur l'en vironnement. Ann. Nutr. Alim.; 34, 791-806.
- BLEVINS, D.G.; BARNETT, N.M. y FROST, W.B.C. 1978. Role of po - tassium and malate in nitrate uptake and translocation by wheat seedling. Plant Physiol.; 62, 784.
- BLIGH, E.G. y DYER, W.J. 1959. A rapid method of total li - pid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology; 37, 911-917.

- BLONDEL, A. y BLANC, D. 1974. Influence of ammonium ion uptake and reduction in young wheat plants. C.R. Acad. Sci. (Paris). Ser. D. ; 277, 1325-1327.
- BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1974. Lectins : A possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. Science ; 185, 269-71.
- BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1975. Immunofluorescent polar tips of Rhizobium japonicum: possible site of attachment or lectin binding. J. Bacteriol.; 125, 1188-94.
- BOLAND, M.J.; FARNDEN, K.J.F. y ROBERTSON, J.G. 1979. Ammonia assimilation in nitrogen-fixing legume nodules. En: Proceedings of the Steenbock-Kettering International Symposium on Nitrogen Fixation. (W.H.Orme -Johnson and W.E. Newton eds.). Univ. Park Press Baltimore, Maryland.
- BOLAND, M.J.; FARNDEN, K.J.F. y ROBERTSON, J.G. 1980. Ammonia assimilation in nitrogen-fixing legume nodules. En: W.H. Orme - Johnson and W.E. Newton, eds. Proceeding of the Sttenbock-Kettering International Symposium on Nitrogen Fixation. Vol. II. University Park Press. Baltimore, Maryland, USA. pp. 33-52.
- BOLLER, B.C. y HEICHEL, G.H. 1983. Photosynthate partitioning in relation to N₂-fixation capability of alfalfa. Crop Science; 25, 635-659.
- BOLTON, J.L. 1962. Alfalfa. Edited N. Polunin. Leonard Hill Limited. Interscience Publishers, Inc. New York.
- BORDELEAU, L.M.; ANTOUN, H. y LACHANCE, R.A. 1977. Effects des souches de Rhizobium meliloti et des coupes successives de la lucerne (Medicago sativa) sur la fixation symbiotique d'azote. Can. J. Plant. Sci., 57, 433-439,
- BORDELEAU, L.M. y ANTOUN, H. 1978. Un méthode rapide de preselection des souches de Rhizobium meliloti. Can J. Plant. Sci., 58, 1125-1126.
- BORDELEAU, L.M.; GIROUX, M.; QUELLET, R. y ANTOUN, H. 1981. Effect du soufre et de l'azote sur la fixation symbiotique d'azote chez les plantules de lucerne (Medicago sativa, L.). Can. J. Plant Sci., 61, 639-645.
- BORTELS, H. 1937. Uber die Wirking von molybdenund vanadium dungungen auf Leguminosen. Arch Mikrobiol.; 8, 13-26.
- BOTHE, H.; NEVER, G.; KALBE, I. y EISBRENNER, H. 1980. Electron donors and hydrogenase in nitrogen fixing microorganisms. En: Nitrogen Fixation, edited by W.D.P. Stewart and J.R.Gallon. Academic Press. pp. 83-112.

- BOTHE, H. y EISBRENNER, G. 1981. The hydrogenase-nitrogenase relationships in nitrogen fixing organisms. En: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*, ed. H. Bothe, A. Trebst pp. 141-50. Berlin. Springer. 384 pp.
- BOUAT, A. y CROUZET, C. 1965. Notes techniques sur un appareil semiautomatique de clorage l'azote et des certains composes volatiles. *Ann. Agr.*; 16, 107-118.
- BOUMA, D. 1967. Nutrient uptake and distribution in subterranean clover during recovery from nutritional stress. I. Experiments with phosphorus. *Aust. J. Biol. Sci.*, 20, 601-612.
- BOURNE, W.F. y MIFLIN, B.J. 1973. Nitrite reductase in barley. *Planta*; 111, 47-54.
- BOUSSINGAULT, J.B. 1838. Citado en : *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. (Emanuel Epstein. Wiley International Edition).
- BOWLES, D.J. 1979. Lectins as membrane components: implications of lectin-receptor. *FEBS Lett.*; 102, 1-3.
- BRESSANI, R. y ELIAS, L.G. 1974. Legume foods. En: *New Protein Foods* (Altschul, A.M. ed.). pp. 230-297. Academic Press. New York.
- BRETELER, H.; HANISCH TEN CATE, CH. y NISSEN, P. 1979. Time-course of nitrate uptake and nitrate reductase activity in nitrogen-depleted dwarf bean. *Physiol. Plant*, 47, 49-55.
- BRETELER, H. y NISSEN, P. 1982. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiol.*, 70, 754-759.
- BRETELER, H. y SMIT, A.L. 1974. Effect of ammonium nutrition on uptake and metabolism of nitrate in wheat. *Neth. J. Agric. Sci.*; 22, 73-81.
- BREVEDAN, R.E. EGLI, D.B. y LEGGETT, J.E. 1978. Influence of N-nutrition of flower and pod absorption and yield of soybeans. *Agron. J.*; 70, 81-84.
- BRILL, W.J. 1977. Biological nitrogen fixation. *Scient. Am.* 236, 68-81.
- BRILL, W.J. 1978. Ammonia production from atmospheric nitrogen by the bacterium, *Azotobacter vinelandii*. En: *Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics*. J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, eds. *Basic Life Sciences*, Vol. 10. pp. 237-245. Plenum. New York.

- BROADBENT, F.E. y CARLTON, A.B. 1978. Field trials with isotopically labelled nitrogen fertilizer. En Nielzen, D. R., McDonald, J.G. (Eds.). Nitrogen in the Environment I. Academic Press, New York.
- BROUGHTON, W.J. 1978. Control of specificity in legume-Rhizobium associations. J. Appl. Bact.; 45, 165-194.
- BROUGHTON, W.J.; HOH, C.H.; BEHM, C.A. y TUNG, H.F. 1978. Development of the nitrogen fixing apparatus, in the legumes, Centrosema pubescens Benth. and Vigna unguiculata, L. Walp. Planta; 139, 183-192.
- BROWN, J.C. y JONES, W.E. 1976. Nitrate reductase activity in calcifugous and calcicolous tomatoes as affected by iron stress. Physiol. Plant, 38, 273.
- BROWN, J.C. y CHANEY, R.L. 1971. Effect of iron on the transport of citrate into the xylem of soybeans and tomatoes. Plant Physiol.; 47, 836-840.
- BROWN, J.R.; THOM, W.O. y WALL, L.L. 1981. Effects of sulphur application on yield and composition of soybeans and soil sulphur. Commun. in Soil Science and Plant Analysis, 12 (3), 247-261.
- BRUINSMA, J. 1961. A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. Biochim. Biophys. Acta, 52, 576-578.
- BRUNETTI, N. y HAGEMAN, R.H. 1976. Comparison of "in vivo" and "in vitro" assays of nitrate reductase in wheat (Triticum aestivum, L.) seedling. Plant Physiol., 58, 583-587.
- BRUNOLD, C. y SCHMIDT, A. 1978. Regulation of sulphate assimilation in plants. Plant Physiol., 61, 342-347.
- BULEN, W.A. y LECOMTE, J.R. 1966. The nitrogenase system - from Azotobacter: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution and ATP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 56, 979-86.
- BURFORD, J.R. y HALL, K.C. 1977. Fluxes of nitrous oxide from a ryegrass sward. Rep. ARC Letcombe Laboratory 1976. pp. 85-88.
- BURG, S.P. 1973. Ethylene in plant growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 591-597.
- BURNS, R.C. y HARDY, R.W.E. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Berlin: Springer 189 pp.
- BURRIS, R.H. 1972. Nitrogen fixation-assay methods and techniques. Methods in Enzimology. IV. S.P. Colowick and N.O. Kaplan eds. Academic press. N.Y. 415.

- BUTZ, R.G. y JACKSON, W.A. 1977. A mechanism for nitrate - transport and reduction. *Phytochem.*, 16, 409-417.
- CALDWELL, A.C.; SEIM, E.C. y REHM, G.W. 1969. Sulfur effects on the elemental composition of alfalfa (Medicago sativa, L.) and corn (Zea mays, L.). *Agronomy Journal*, 61, 1969.
- CALLAHAM, D.A. 1979. A structural basis for infection of root hairs of Trifolium regens by Rhizobium trifolii. MS Thesis. Univ. Mass., Amherst. 41 pp.
- CAMPBELL, W.H. 1976. Separation of soybean leaf nitrate reductases by affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.*, 7, 239-244.
- CAMPOS, J.A.; LLUCH, C.; LIGERO, F. y RECALDE, L. 1983. Influencia del azufre, nitrógeno y Rhizobium phaseoli sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de Phaseolus vulgaris, V. Reunión de la Soc. Española de Fisiol. Vegetal. Murcia. A-27 p.77.
- CANTLIFFE, D.J. 1972. Nitrate accumulation in vegetable crops as affected by photoperiod and light duration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97, 414-418.
- CAPITAN, G. y MARTINEZ, A.F. 1954. Sobre la determinación espectrofotométrica de fósforo con "Amidol". *An. Edaf. y Fisiol. Veg.*, XIII, 767-790.
- CARLSON, R.W. 1980. Surface chemistry of Rhizobium. En: *Ecology of Nitrogen Fixation*, ed. W.J. Broughton, Vol.2. Oxford, Oxford Univ. Press.
- CARTWRIGHT, P.M. 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of Phaseolus vulgaris, L. *Ann. Bot.*, 31, 309-321.
- CASADESUS, J. y OLIVARES, J. 1978. Genética de Rhizobium y de la fijación de nitrógeno. *Anal. Edaf. y Agrobiol.*; 37, 915-948.
- CASPER, H. 1975. (G) Nitrate availability as a function of soil water content. Modell experiments with young maize plants. Diss. Fachbereich 19 Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität. Giessen.
- CHADWICK, A.V. y BURG, S.P. 1970. Regulation of root growth by auxin-ethylene interaction. *Plant Physiol.*; 45, 192-200.
- CHANDLER, M.R. 1978. Some observations on infection of Arachis hypogaea, L. by Rhizobium. *J. Exp. Bot.*; 29, 749-55.

- CHAPMAN, H.D. 1966. Diagnostic criteria for plants and soils. Univ. of California. Div. of Agric. Sciences.
- CHEN, C.L.H. 1967. Assimilation of CO_2 by Medicago sativa leaves in relation to sulphur nutrition. Ph. D. Thesis University of California. Davis.
- CHEN, P-C y PHILLIPS, D.A. 1977. Induction of nodule senescence by combined nitrogen in Pisum sativum. Plant Physiol. Lancaster, 59, 440-442.
- CHENIAE, G. y EVANS, H.J. 1960. Physiological studies on nodule-nitrate reductase. Plant Physiol. 35, 454-462.
- CHING, T.M.; HEDTKE, S.; RUSSELL, S.A. y EVANS, H.I. 1975. Energi state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-grown plants. Plant Physiol.; 55, 796-798.
- CLARKSON, D.T. y HANSON, J.B. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol.; 31, 239-298.
- CLARKSON, D.T. y WARNER, A.J. 1979. Relationship between root temperature and the transport of ammonium and nitrate ions by Italian and perennial ryegrass (Lolium multiflorum and Lolium perenne). Plant Physiol.; 64, 557-561.
- CLEMENT, C.R.; HOPPER, M.J. y JONES, L.H.P. 1978. The uptake of nitrate by Lolium perenne from flowing nutrient solution. J. Expt. Bot.; 29, 453-464.
- COIC, Y.; LESAIN, C. y LEROUX, F. 1962. Comparison of the effect of NO_3 and NH_4 nutrition with or without phosphorus deficiency, on the absorption and metabolism of anions and cations, and especially of organic acids, in maize. C.R. Acad. Sci. Paris, 25, 346-348.
- COIC, Y. 1971. Influence du metabolisme NO_3^- dans les racines sur l'etat nutritionnel de la plant. En: Samish, R.H. Ed. Recent Advances in Plant Nutrition. p. 217-227. Gordon and Breach Sci. Publ. New York.
- COIC, Y.; LESAIN, C.; PIOLLAT, M.T. y LELANDIS, M. 1970. Effect of nitrate N nutrition on changes in concentrations of cations, K, Ca, Hg in the aerial parts of tobacco plants. Potash Rev.; 3, 1-8.
- COOKE, G.W. 1967. Fertilizing for Maximum Yield. Crosby Lockwood and Son. Ltd. London.
- COOKSON, C.; HUGHES, H. y COOMBS, J. 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in Phaseolus vulgaris, L. Planta, 148, 338-345.

- COWLING, D.W. y LOCKYER, D.R. 1976. Growth of perennial rye grass (Lolium perenne, L.) exposed to a low concentration of sulphur dioxide. *J. Exp. Bot.*; 27, 411-417.
- CUBERO, J.I. y MORENO, M.T. 1983. Leguminosas de grano. Leguminosas de Grano (J.I. Cubero, ed.) Mundi-Prensa, eds.
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E. y HAGEMAN, R.H. 1972. Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. II wheat roots. *Biochim. Biophys. Acta*, 283, 513-519.
- DALLING, M.J.; HALLORAN, G.H. y WILSON, J.H. 1975. The relation between nitrate reductase activity and grain nitrogen productivity in wheat. *Aust. J. Agric. Res.*; 26, 1-10.
- DALTON, H. y POSTGATE, J.R. 1969. Effect of oxygen on growth of Azotobacter chroococcum in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 54, 463-473.
- DANIELSSON, C.E. 1949. Seed globulins of the Graminae and Leguminosae. *Biochem. J.*; 44, 387-400.
- DART, P.J. 1974. Development of root nodule symbiosis. The infection process. En: *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam: North Holland. 381-429.
- DART, P.J. 1977. Infection and development of leguminous nodules. En: *A Treatise on Dinitrogen Fixation*, ed. R.W. F. Hardy, W.S. Silver.; 3, 367-72. New York. Wiley 675 pp.
- DART, P.J. y CHANDLER, M. 1971. *Ann. Rep. Rothamsted Exper. Stn. Part. 1.* p. 99.
- DAVIDIAN, J.C. y SALSAC, L. 1979. Interaction anions-cations (Ca^{++} , K^+ , NO_3^- , Cl^-) et influence sur l'induction de l'activité nitrate reductase dans les racines excisées de Mais. *Physiol. Veg.* ; 2, 375-385.
- DAY, J.; DART, P. y ROUCHLEY, R. 1975. Ethylene as a factor limiting the legume-Rhizobium symbiosis in tube culture. *Ann. Appl. Biol.*, 81, 119 (abstract).
- DAZZO, F.B. 1979. Adsorption of microorganisms to roots and other plant surfaces. En: *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*. New York. Wiley. 253-316.
- DAZZO, F.B. y BRILL, W.J. 1978. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the Rhizobium-clover - symbiosis. *Plant Physiol.*; 62, 18-21.

- DAZZO, F.B. y HUBBELL, D.H. 1975. Antigenic differences between infective and noninfective strains of Rhizobium trifolii. Appl. Microbiol. 30, 172-77.
- DAZZO, F.B. y HUBBELL, D.H. 1975. Cross-reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in Rhizobium trifolii-clover association. Appl. Microbiol.; 30, 1017-30.
- DAZZO, F.B.; NAPOLI, C. y HUBBELL, D.H. 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the Rhizobium-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol.; 32, 166-71.
- DAZZO, F.B.; URBANO, M.R. y BRILL, W.J. 1979. Transient appearance of lectin receptors on Rhizobium trifolii. Curr. Microbiol.; 2, 15-20.
- DAZZO, F.B.; YANKE, W.E. y BRILL, W. 1978. Trifoliin: A Rhizobium recognition protein from white clover. Biochim. Biophys. Acta, 539, 276-86.
- DEAN, J.R. y CLARK, K.W. 1980. Effect of low level nitrogen fertilization on nodulation, acetylene reduction and dry matter in faba beans and three other legumes. Can. J. Plant. Sci.; 60, 121-130.
- DECKARD, E.L.; LAMBERT, R.J. y HAGEMAN, R.H. 1973. Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yields of grain protein. Crop Sci.; 13, 343-350.
- DE DUVE, Ch. 1948. A spectrophotometric method for the simultaneous determination of myoglobin and hemoglobin in extracts of human muscle. Acta Chem. Scand., 2, 264 - 289.
- DEJONG, T.M.; BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B. y PHILLIPS, D.A. 1982. Improvement of symbiotic properties in Rhizobium leguminosarum. by plasmid transfer. J. Gen. Microbiol.; 128, 1829-38.
- DEMETERIO, J.L.; ELLIS, R.J. y PAULSEN, G.M. 1972. Nodulation and nitrogen fixation by two soybean varieties as affected by phosphorus and zinc nutrition. Agron. J.; 64, 556-568.
- DENAIRE, J. y TRUCHET, G. 1974. Genetics of Rhizobium: a short survey. Int. Symp. Nitrogen Fixation, Washington.
- DIJKSHOORN, W. y VAN WIJK, A.L. 1967. The sulphur requirements of plants as evidenced by the sulphur-nitrogen ratio in the organic matter a review of published data. Plant Soil, XXVI, 129 -157.

- DILWORTH, M.S. 1974. Dinitrogen Fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*; 25, 81-114.
- DILWORTH, M.J. 1979. Host and Rhizobium contributions to the physiology of legume nodules. En: Proceedings of the Steenbock-Kettering International Symposium on Nitrogen Fixation. (W.H. Orme-Johnson and W.E. Newton, eds.). Univ. Park Press. Baltimore, Maryland.
- DILWORTH, M.J. y COVENTRY, D.R. 1977. Stability of leghaemoglobin in yellow lupin nodules. En: Recent Developments in Nitrogen Fixation, eds. W. Newton, J.R. Postgate and C. Rodriguez-Barrueco, Academic Press, London, 431-442.
- DILWORTH, M.J. y KIDBY, D.K. 1968. Localization of iron and leghaemoglobin in the legume root nodule by electron microscope autoradiography. *Exp. Cell Res.*; 49, 148-159.
- DIXON, R.O.D. 1969. Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). *Ann. Rev. Microbiol.*; 23, 137-158.
- DIXON, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteria: occurrence and properties. *Arch. Microbiol.*; 85 193-201.
- DIXON, R.O.D. 1978. Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in rhizobia. *Biochimie*, 60, 233-36.
- DOBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLAENDER, A.; FRANCO, A. A.; NEYRA, C.A. y SCOTT, D.B. 1978. Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. New York.; Plenum. 398 pp.
- DRENNAN, D.S.H. y NORTON, C. 1972. The effect of ethrel on nodulation in Pisum sativum, L. *Plant and Soil*, 36 , 53-57.
- DREVN, Jr.J. y SALSAC, L. 1984. Is hydrogenase activity beneficial for nitrogen fixation by soybean root nodules. En: Advances in Nitrogen Fixation Research. Eds. Veeger, C. y Newton, W.E. Nifhoff Jupk, pp. 499.
- DUBE, S.D. y MISRA, P.H. 1970. Effect of sulphur deficiency on growth yield and quality in some of the important leguminous crops. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, 18, 375-378.
- DULLAART, J. 1970. The bioproduction of indole-3-acetic acid and related compounds in root nodules and roots of Lupinus luteus, L. and by its rhizobial symbiont. *Acta botanica neerlandica*, 19, 573-618.

- ECKERSON, S.H. 1967. Conditions affecting nitrate reduction by plants. *Can. J. Plant Sci.*; 46, 677.
- EILRICH, G.L. y HAGEMAN, R.H. 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.*, 43 930-940.
- EISBRENNER, G.; EVANS, H.J. 1982a. Spectral evidence for a component involved in hydrogen metabolism of soybean nodule bacteroids. *Plant Physiol.*; 70, 1667-72.
- EISBRENNER, G.; EVANS, H.J. 1982 b. Carriers in the electron transport from molecular hydrogen to oxygen in Rhizobium japonicum bacteroids, *J. Bacteriol.*; 149, 1005-12.
- EISBRENNER, G. y EVANS, H.J. 1983. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. *Ann. Rev. Plant Physiol.*; 34, 105-36.
- EISBRENNER, G.; HICKOK, R.E. y EVANS, H.J. 1982. Cytochrome patterns in Rhizobium japonicum cells grown under chemolithotrophic conditions. *Arch. Microbiol.*, 132, 230 -35.
- EMBLETON, T.W. y JONES, W.W. 1966. Avocado and Mango : The Nutrition of Fruit Crops. N.F. Childers. Ed. Somerset Press. Somerville, N.J. pp. 51-76.
- EMERICH, D.W. y BURRIS, R.H. 1978. Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 536, 172-183.
- EMES, M.J.; ASHIHARA, H. y FOWLER, M.W. 1979. The influence of nitrate ion on particulate 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in pea roots. *FEBS Lett.*; 105, 370-372.
- EPPENDORFER, W. 1968. The effect of nitrogen and sulphur on changes in nitrogen fractions of barley plants and various early stages of growth and on yield and amino acid composition of grain. *Plant and Soil*, 29, 424 -438.
- EPSTEIN, E. 1972. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. J. Wiley and Sons, Inc. (Eds.) Wiley International Edition. USA.
- ERGLE, D.R. y EATON, F.M. 1951. Sulphur nutrition of cotton. *Plant Physiol.* , 26, 639-654.

- EVANS, H.J.; BISHOP, P.E. e ISRAEL, D. 1976. Enzymology of symbiotic dinitrogen fixation. En: Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. (W.E. Newton and C.J. Nyman, eds.). Vol. 1. pp. 234-247. Washington State Univ. Press. Pullman.
- EVANS, H.J.; EISBRENNER, G.; CANTRELL, M.A.; RUSSELL, S.A. y HANUS, F.J. 1982. The present status of hydrogen recycling in legumes. *Isr. J. Bot.*; 31, 72-88.
- EVANS, H.J.; EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGUESO, T.; ALBRECHT, S.L. y MAIER, R.J. 1978. Hydrogen metabolism in legume nodules and rhizobia: Some recent developments. En: *Hydrogenases, Their Catalytic Activity, Structure and Function*. Eds. H.G. Schlegel, K. Schneider, pp. 327-51. Göttingen. Goltze, K.G. 453 pp.
- EVANS, H.J. y NASON, A. 1953. Piridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.* 28, 233-254.
- EVANS, H.J. y RUSSELL, S.A. 1971. Physiological chemistry of symbiotic nitrogen fixation by legumes. En: *Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Ed. J. Postgate. Plenum Press, London 191-244.
- EVANS, J. 1982. Response of soybean-Rhizobium symbiosis to mineral nitrogen. *Plant and Soil*, 66, 439-442.
- EVENSEN, K.B. y BLEVINS, D.G. 1981. Differences in endogenous levels of gibberellinlike substances in nodules of Phaseolus lunatus, L. plants inoculated with two Rhizobium strains. *Plant Physiol.*; 68, (1), 195-198.
- EWART, J.A.D. 1978. Glutenin and dough tenacity. *J. Sci. Food Agric.*; 29, 551-556.
- FAGERIA, N.K. 1977. Effect of phosphatic fertilization on growth and mineral composition of pea plants (Pisum sativum, L.). *Agrochimica*, 21, 75-78.
- FÄHRAEUS, G. y LJUNGGREN, H. 1967. Preinfection phases of the legume symbiosis, En: *The Ecology of Soil Bacteria*. Liverpool, Liverpool Univ. Press.
- FEIGENBAUM, S.; BARCILY, S.; LEVIN, I. y KAFKAFI, U. 1976. Studies on fertilization of field-grown irrigated alfalfa. II Effect of N and K supply on growth rates, dry matter and protein yield. Final report to Israel Chemical Ltd. Proj. no. 301:010. ARO. Bet Daga, Israel.
- FALLER, N.; HERWIG, K. y KÜHN, H. 1970. The uptake of sulphur dioxide (SO_2^{35}) from the air. Effect on crop yield. *Plant and Soil*, 33, 177-191.

- FAO, 1975. Protein requirements. Food Agriculture Organization. U.N. FAO Nutr. Studies No. 16. FAO. Rome.
- FAO 1964. Las leguminosas en la nutrición humana. Food Agriculture Organization. U.N. FAO Nutr. Studies No. 30. FAO. Rome.
- FAO 1975. Manual sobre necesidades nutricionales del hombre. Food Agriculture Organization. U.N. FAO. Nutr. Studies . No. 51. FAO. Rome.
- FARNDEN, K.J.F. 1981. ATP in pathways of assimilation of NH_4^+ En: Current Perspectives in Nitrogen Fixation. pp. 128-9. Australian Acad. of Sciences. Canberra.
- FERRARI, G. y RENOSTO, F. 1972. Regulation of sulfate uptake by excised barley roots in the presence of selenate. Plant Physiol.; 49, 114-116.
- FERRARI, T.E. y VARNER, J.E. 1970. Control of nitrate reductase activity in barley aleurone layer. Proc. Natl. Acad. Sci., 65, 729-736.
- FISHBECK, K.A. y PHILLIPS, D.A. 1981. Combined nitrogen effect on vegetative regrowth of symbiotically-grown alfalfa. Agron. J.; 73, 975-978.
- FLETCHER, W.W.; ALCORN, J.W.S. y RAYMOND, J.C. 1958. Effect of gibberellic acid on the nodulation of white clover. Nature (Land). 182, 1319-20.
- FOLIN, O. y MALMROS, H. 1929. An improved form of Folin's - micromethod for pool sugar determinations. Journal Biology and Chemistry, 83, 115-119.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C. y NEYRA, C.A. 1979. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in Phaseolus vulgaris. Plant Physiol.; 63, 421-424.
- FRENKEL, C.; HADDON, V.R. y SMALLER, J.M. 1975. Promotion of softening and ethylene synthesis in Bartlett pears by 3-methylene oxindole. Plant Physiol.; 56, 647-649.
- FRENKEL, C.; KLEIN, I. y DILLEY, D.R. 1968. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. Plant Physiol.; 43, 1146-1153.
- FRIEDRICH, B.; HEINE, E.; FINCK, A. y FRIEDRICH, C.G. 1981. Nickel requirement for active hydrogenase formation in Alcaligenes eutrophus. J. Bacteriol.; 145, 1144-49.

- FRIEDRICH, J.W. y SCHRADER, L.E. 1978. Sulphur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. *Plant Physiol.*; 61, 900-903.
- FRIEDRICH, J.W.; SMITH, D. y SCHRADER, L.E. 1977. Nitrate reductase activity and N fractions in timothy and switch grass as influenced by N and S fertilization. *Can J. Plant. Sci.*; 57, 1151-1157.
- FUJIHARA, S. y YAMAGUCHI, M. 1980. Asparagine formation in soybean nodules. *Plant Physiol.*; 66, 139-141.
- GARCIA, R.L. y HANWAY, J.J. 1976. Foliar fertilization of soybeans during the sees-filling period. *Agronomy Journal*, 68, 653-657.
- GATES, C.T. 1974. Nodule and plant development in Stylosanthes humilis, H.B.K.: Symbiotic response to phosphorus and sulfur. *Aust. J. Bot.*, 22, 45-55.
- GATES, C.T. y MULLER, W.J. 1979. Nodule and plant development in the soybean, Glycine max (L) Merr : Growth response to nitrogen, phosphorus and sulphur. *Aust. J. Bot.*, 27, 203-215.
- GAUCH, H.G. 1972. Inorganic plant nutrition. Drawden, Hutchinson and Ross. Inc. Stroudsburg p. 378-394.
- GIBSON, A.H. 1976. Limitation to dinitrogen fixation by legumes. En: W.E. Newton, C.J. Nyman, eds. *Proc Ist. Int. Symp. Nitrogen Fixation*. Washington State University - Press. Pullman pp. 400-428.
- GIBSON, A.H. 1977. *Treatise on Dinitrogen Fixation*. Section IV. Agronomy and Ecology Ed. R.W.F. Hardy and A.H. Gibson 393-450. N.Y. John Wiley.
- GIBSON, A.H. y PAGAN, J.D. 1977. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase-deficient mutants of "Rhizobium". *Planta* ; 134, 17-22.
- GIBSON, A.H.; SCOWCROFT, W.R. y PAGAN, J.D. 1977. Nitrogen fixation in plants: an expanding horizon ?. En: *Recent Developments in Nitrogen Fixation* (W. Newton, J.K. Postgate, and C. Rodriguez-Barrueco, eds.). pp. 387-417. Academic Press. New York.
- GIOVANELLI, J.; MUDD, S.H. y DATKO, A.H. 1980. Sulfur amino acids in plants. En: *The Biochemistry of Plants*. P.K. Stumpf and E.E. Coun. Vol. 5. Aminoacids and Derivatives. pp. 453-505.

- GOMES, J.F.M.; PURCINO, A.A.C. y LYND, J.Q. 1983. Soil potassium effects influencing growth, nodulation, N₂ fixation, and ureide transformations of soybeans grown on a typic eustrustox. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.* 14 (11), 1133-1150.
- GONZALEZ DE AGUILAR, C.; BAREA, J.M.; OLIVARES, J. 1983. Simbiosis Rhizobium-leguminosa. *Investigación y Ciencia*, Julio, nº 82, 84-93.
- GOODCHILD, D.C. 1977. The ultraestructure of root nodules in relation to nitrogen fixation. *Int. Rev. Cytology.* Suppl. 6. pp. 235-288. Academic Press, New York.
- GOODCHILD, D.J. 1978. The ultraestructure of root nodules in relation to nitrogen fixation. *Int. Reve. Cytol.*: 41, 235-288.
- GOODCHILD, D.J. y BERGERSEN, F.J. 1966. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol.*; 92, 204-13.
- GOODLASS, G. y SMITH, K.A. 1979. Effects of ethylene on root extension and nodulation of pea (Pisum sativum, L.) and white clover (Trifolium repens, L.). *Plant and Soil*, 51, 387-395.
- GOURRET, J.P. y FERNANDEZ-ARIAS, H. 1974. Etude ultrastructurale et cytochimique de la differentiation des bacteroides de Rhizobium trifolii. Dangeard dans les nodules de Trifolium repens, L. *Can J. Microbiol.* 20, 1169-1181.
- GOVINDJEE, W.T. y MARKS, S.B. 1978. Manganese and chloride: their roles in photosynthesis. En: *Photosynthetic Oxygen Evolution*. H. Metzner, ed. pp. 321-344. Academic - New York.
- GRAHAM, P.H. y ROSAS, J.C. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of Phaseolus vulgaris, L. inoculated with Rhizobium. *J. Agric. Sci.* 88, 503-508.
- GRAHAM, T.L. 1980. Recognition in the Rhizobium-legume symbiosis. En: *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. A. Atherly K. Giles. New York. Academic, Press.
- GRANT, B.R.; ATKINS, C.A. y CANVIN, D.T. 1970. Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase in spinach and sunflower leaves. *Planta*, 94, 60-72.
- GREENWOOD, D.J. 1980. Fertilizer use and food production: World scene. *Fert. Res.*; 2, 35-51.
- GROBBELAAR, N.; CLARKE, B. y HOUGH, M.C. 1970. The inhibition of root nodulation by ethylene. *Agroplanta*, 2, 81-82.

- GROBBELAAR, N.; CLARKE, B. y HOUGH, M.C. 1971. The nodulation and nitrogen fixation of isolated roots of Phaseolus vulgaris, L.III. The effect of carbon dioxide and ethylene. Plant and Soil, Special Volume, 216-223.
- GUNNING, B.E.S.; PATE, J.S.; MINCHIN, F.R. y MARKS, I. 1974. Quantitative aspects of transfer cell structure in relation to vein loading in leaves and solute transport in legume nodules. En: Transport at the cellular level, Society for Experimental Biology Symp. ; 28, 87-126.
- GUPTA, Y.P.; GROVER, H.L. y KAPOOR, A.C. 1978. Preliminary studies on the quality characters of soybeans. Curr.Agric. 2, 39-43.
- HAAKER, H.; DEKOK, A. y VEEGER, C. 1974. Regulation of dinitrogen in intact Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta, 357, 344-357.
- HAAKER, H. y VEEGER, C. 1977. Involvement of the cytoplasmic membrane in nitrogen fixation by Azotobacter vinelandii Eur. J. Biochem.; 77, 1-10.
- HADDOCK, B.A. y JONES, C.W. 1977. Bacterial respiration. Bacteriol.Rev.; 41, 47-99.
- HAGEMAN, R.H. 1979. Integration of nitrogen assimilation in relation to yield. En: Nitrogen Assimilation of Plants (E.J. Hewitt and C.V. Cutting, eds.) pp.591-612. Academic Press. New York.
- HAGEMAN, R.H. 1980. Effect of form of nitrogen on plant growth. En: Am.Soc. of Agronomy and Soil Science Soc. of America. Nitrification Inhibitors-Potentials and Limitations. pp. 47-61.
- HAGEMAN, R.H. y BURRIS, R.H. 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 75, 2699-2702.
- HAGEMAN, R.H.; DALLING, M.; REED, A. y FEMMER, R. 1980. Some new aspects of the 'in vivo' assay for nitrate reductase in wheat (Triticum aestivum) leaves I. Reevaluation of nitrate pool sizes. Plant Physiol.; 65, 55-7.
- HAGEMAN, R.H. y HUCKLESBY, D.P. 1971. Nitrate reductase from higher plants. En: Methods of Enzymology. (A San Pietro, eds.). Vol.23, pp.491-503. Academic Press, New York.
- HAGSTROM, G.R. y BERGER, K.C. 1965. Molybdenum deficiencies of Wisconsin soils. Soil Sci.; 99, 52-56.
- HALLSWORTH, E.G. 1958. Nutrition of the Legumes. Butterworth Sci. Publ. London, 359 pp.

- HALLSWORTH, E.G.; WILSON, S.B. y ADAMS, W.A. 1960. Cooper and cobalt in nitrogen fixation. *Nature*, 187, 79-80.
- HAM, G.E.; LIENER, I.E.; EVANS, S.D.; FRAZIER, R.D. y NELSON, W.W. 1975. Yield and composition of soybean as affected by N and S fertilization. *Agron. J.* 67, 293-297.
- HANWAY, J.J. 1975. Interrelated development and biochemical processes in the growth of soybeans plants. En: Lowell D.Hill (ed.) *Proc. World Soybean Res. Conf. University of Illinois. Urbana III.*
- HANWAY, J.J. y DUMENIL, L.C. 1965. Evaluation of the availability of K in crop residues. *Plant Food Review*, 11 (2), 5-8.
- HAQUE, I.; AMARA, D.S. y KAMARA, C.S. 1980. Effects of inoculation and N fertilizer on soybean in Sierra Leone. *Commun. In Soil Sci. and Plant Anal.* 11, 11-24.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C. y HOLSTEN, R.D. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5, 57-81.
- HARDY, R.W.F. y HAVELKA, U.D. 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. En: *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Ed. P.S. Nutman. Cambridge. University Press. Cambridge. England.
- HARDY, R.W.F. y KNIGHT, E.Jr. 1968. The biochemistry and postulated mechanisms of N₂ fixation. En: *Progress in Phytochemistry* (L. Reinhold, ed.). John Wiley and Sons Ltd. Sussex. 387.
- HAVELKA, U.D. y HARDY, R.W.F. 1976. Legume N₂ fixation as problem in carbon nutrition. En: *Proc. Inst. Int. Symp. on Nitrogen Fixation*, Vol. 2 (W.E. Newton and C.J. Nyman eds), pp. 456-475. Washington State University Press.
- HEBER, U.; KIRK, M.R.; GIMMLER, H. y SCHAFFER, G. 1974. Uptake and reduction of glycerate by isolated chloroplasts. *Planta.* 120, 32-46.
- HENDRIX, J.E. 1967. The effect of pH on the uptake and accumulation of phosphate and sulfate ions by beans plants. *Amer. J. Bot.* 54, 560-564.
- HELLRIEGEL, H. y WILFARTH, H. 1888. *Untersuchen über die Stickstoff-nahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft Ztsch. r.f.a. Rübenzucker-Industrie.*



- HEUER, B. y PLAUT, Z. 1978. Reassessment of the in vivo - assay for nitrate reductasa in leaves. Physiol. Plant. 43, 306-312.
- HEWITT, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Hort. Plantation Crops, Tech. Commun., 22.
- HEWITT, E.J. 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Annu. Rev. Plant Physiol., 26, 74-100.
- HEWITT, E.J. 1970. Physiological and biochemical factors - which control the assimilation of inorganic nitrogen supplies by plants. En: E.A. Kirkby: Nitrogen Nutrition of the Plant. The University Leeds. 1970. pp. 78-103.
- HEWITT, E.J. y CUTTING, C.V. 1979. Nitrogen Assimilation in Plants. Academic Press, New York.
- HEWITT, E.J.; HUCKLESBY, D.P. y NOTTON, B.A. 1976. Nitrate metabolism. En: Plant Biochemistry. J. Bonner and J. E. Varner, eds. pp. 633-681. Academic, New York.
- HEWITT, E.J. y SMITH, T.A. 1975. Plant mineral nutrition. English Univ. Press. St. Pauls House, Warwick Lene. London. p. 176-222.
- HEYTLER, P.G. y HARDY, R.W.F. 1981. A PEP-carboxylase in Rhizobium-nodulated soybeans roots. Plant Physiol., 67, 450s.
- HIGASHI, S. 1966. Electron microscopie studies on the infection thread developing in the root hair of Trifolium repens, L. infected with Rhizobium trifolii. J.Gen. Appl. Microbiol., 12, 147-56.
- HILL-COTTINGHAM, D.G. y LLOYD-JONES, C.P. 1980. The influence of nitrate supply on nitrogen fixation during growth of field bean Vicia faba in sand. Physiol. Plant., 48, 116-120.
- HOCH, G.E.; LITTLE, H.N. y BURRIS, R.H. 1957. H₂ evolution from soybean root nodules. Nature, 179, 430-31.
- HOLL, F.B. y LARVE, T.A. 1976. Genetic of legume plant hots. Int. Symp. Nitrogen Fixation. Washington.
- HOUWAARD, F. 1978. Influence of ammonium chloride on the nitrogenasa activity of nodulated pea plants (Pisum sativum). Appl. Environ. Microbiol., 35, 1061-1065.
- HOUWAARD, F. 1980. Influence of ammonium and nitrate nitrogen on nitrogenase activity of pea plants as affected by light intensity and sugar addition. Plant and Soil, 54, 271-282.

- HUBBELL, D.H. 1970. Studies on the root hair "curling factors" of Rhizobium. Bot. Gaz., 131, 337-42.
- HUBBELL, D.H. y ELKAN, G.H. 1967. Correlation of physiological characteristics with nodulating ability in Rhizobium japonicum. Can. J. Microbiol., 13, 235-41.
- HUBER, D.M.; WARREN, H.L.; NELSON, D.W.; TSAI, C.Y. y SHANER, G.E. 1980. Response of winter wheat to inhibiting nitrification of fall-applied nitrogen. Agron. J., 72, 532-637.
- HUBER, T.A. y STREETER, J.G. 1981. Asparagine synthesis in soybean root nodules. Plant Physiol., 67, 43 s.
- HUCKLESBY, D.P.; CAMMACK, R. y HEWITT, E.J. 1979. Properties and mechanisms of nitrite reductase. En: Nitrogen Assimilation of Plants. (E.J. Hewitt and C.V. Cutting, eds) pp. 245-254. Academic Press, New York.
- HUTCHINSON, J. 1973. Families of Flowering Plants. 3rd ed. Part 1. Clarendon, Oxford.
- HWANG, J.C.; CHEN, C.H. y BURRIS, R.H. 1973. Inhibition of nitrogenase-catalyzed reductions. Biochim. Biophys. Acta., 292, 256-270.
- HYODO, H. y YANG, S.F. 1971. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. Plant Physiol., 47, 765-770.
- JACKSON, W.A. y VOLK, R.J. 1981. Nitrate transport processes and compartmentation in root systems. En: Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen. Ed. by J.M. Lyons, R.C. Valentine, D.A. Phillips, D.W. Rains and R.C. Huffaker (Plenum Pub. Co.) pp. 517-532.
- JANSSEN, K.A. y VITOSH, M.L. 1974. Effect of lime, sulfur, and molybdenum on N₂ fixation and yield of dark red kidney beans. Agron. J., 66, 736-740.
- JAWORSKI, E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochem Biophys. Res. Commun., 43, 1274-1279.
- JOHNSON, C.B. 1976. Nitrate reductase as a possible predictive test of crops yield. Planta, 128, 127.
- JOHNSON, J.L.; HAINLINE, B.E.; RAJAGOPALAN, K.V. 1980. Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase, and nitrate reductase. J. Biol. Chem., 255, 1783-1791.

- JOHNSTON, A.E. 1976. Additions and removals of nitrogen and phosphorus in long-term experiments at Rothamsted and Woburn and the effect of the residues on total soil nitrogen and phosphorus. En: Agriculture and Water Quality. Min. Agric. Fish. Fd. Tech. Bull. 32, 111-144.
- JOLLY, S.O.; CAMPBELL, W. y TOLBERT, N.E. 1976. NADPH- and NADH-nitrate reductases from soybean leaves. Arch. Biochem. Biophys., 174, 429-439.
- JOLLY, S.O. y TOLBERT, N.E. 1978. NADH-nitrate reductase inhibitor from soybean leaves. Plant Physiol., 62, 197.
- JONES, J.B. 1970. Distribution of 15 elements in corn leaves. Commun. Soil Sci. Plant Anal. I, 27-34.
- JONES, R.W. y SHEARD, R.W. 1977. Conditions affecting in vivo nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues. Can. J. Bot., 55, 896-901.
- JORDAN, H.V. y ENSMINGER, L.E. 1958. The role of sulphur in soil fertility. Adv. in Agron., 10, 407-434.
- KAMBERGER, W. 1979. An ouchterlony double diffusion study on the interaction between legume lectins and rhizobial cell surface antigens, Arch. Microbiol., 121, 83-90.
- KAPOR, A.; MALICK, C.P. y DHAWAN, A.K. 1978. Nitrate assimilation in Crotalaria juncea (L) pollen suspension culture. Plant Cell Physiol., 19, 685-688.
- KAPOOR, A.C. y GUPTA, Y.P. 1977. Changes in proteins and amino acids in developing soybean seed and effect of phosphorus nutrition. J. Sci. Fd. Agric., 28, 113-120.
- KEFFORD, N.P.; BROCKWELL, J. y ZWAR, J.A. 1960. The symbiotic synthesis of auxin by legumes and nodule bacteria and its role in nodule development. Aust. J. Biol. Sci., 13, 456-467.
- KEILING, D. y SMITH, J.D. 1947. Hemoglobin and N₂ fixation in the root nodules of leguminous plants. Nature, 159, 692-695.
- KENDE, H. y SHEN, T.C. (1972). Nitrate reductase in Agrostemma githago. Comparison of the inductive effects of nitrate and cytokinin. Biochim. Biophys. Acta, 286, 118.
- KENNEDY, I.R. 1966. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. II Pulse labelling of Serradella nodules with ¹⁵N. Biochem. Biophys. Acta, 130, 295-303.

- KENNEDY, I.R.; RIGAUD, J. y TRINCHANT, J.C. 1975. Nitrate reductase from bacteroids of Rhizobium japonicum: enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta*, 397, 25-35.
- KENNEDY, C. y EADY, R.R. 1979. Regulation of nitrogen fixation: the effects of ammonium and oxygen on nitrogenase synthesis. En: *Nitrogen Assimilation by Plants*. (E.J. Hewitt and C.V. Cutting, eds) pp. 73-84. Academic Press New York.
- KEY, J.L.; BARNETT, N.M. y LIN, C.Y. 1967. RNA and protein biosynthesis and the regulation of cell elongation by auxin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 49-62.
- KIRKBY, E.A. y HUGHES, A.D. 1970. Some aspects of ammonium and nitrate nutrition in plant metabolism. En: *E.A. Kirkby: Nitrogen Nutrition of the Plant*, Univ. of Leeds.
- KIRKBY, E.A. y KNIGHT, A.H. 1977. Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiol.*, 60, 349-353.
- KLEIN, H. y JAGER, H.J. 1978. Some aspects of relation between nitrogen metabolism in Pisum sativum and mineral nutrition. *Plant Soil*, 50, 25-35.
- KLEINKPF, G.E.; WALLACE, A. y CHA, J.W. 1975. Sodium relations in desert plants. Some physiological responses of Atriplex confertifolia to different levels of sodium chloride. *Soil Sci.*, 120, 45-48.
- KLEPPER, L.; FLESHER, D. y HAGEMAN, R.H. 1971. Generation of nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, 48, 580-590.
- KLIEWER, M. y EVANS, H.J. 1962. Physiological studies on the B₁₂ coenzyme content of nodules. *Plant Physiol.*, 38, 55-59.
- KNIGHT, E. Jr. y HARDY, R.W.F. 1966. Isolation and characteristics of flavodoxin from N-fixing Clostridium pasteurianum. *J. Biol. Chem.*, 241, 2752-2756.
- KOCH, B. y EVANS, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.*, 41, 1748.
- KONDOROSI, A.; KISS, G.B.; FORRAI, T.; VINCZE, E. y BANFALVI, Z. 1977. Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. *Nature (London)*, 268, 525-527.
- KROGMANN, D.W.; JAGENDORF, A.T. y AVRON, M. 1959. Uncouplers of spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol.*, 34, 272-277.

- KUBO, H. 1939. Über Hämprotein aus den Wurzalknöllchen von Leguminosen. Acta Phytochim. , 11, 195-200.
- KUMAR, V. 1978. Availability of sulphur to plants as affected by sulphur, phosphorus, zinc and molybdenum application. Ph. D. Thesis, Haryana Agricultural University. Hissar, India.
- KUMARASHINGE, R.M.K. y NUTMAN, P. 1977. Rhizobium-stimulated callose formation in clover root hairs and its relation to infection. J. Exp. Bot., 28, 961-76.
- KUO , T.; KLEINHOF, A. y WARNER, R.L. 1980. Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves. Plant Sci. Lett., 17, 371- 381.
- KURZ, W.G.W. y LA RUE, T.A. 1975. Nitrogenase activity in Rhizobium in absence of plant host. Nature, 256, 407-409.
- LACHICA , M. 1964. Determination of sulphur in plant material. Analyst., 89, 61-66.
- LACHICA , M.; AGUILAR, A.; YAÑEZ, J. 1973. Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. (II). An. Edaf. y Agrobiol., XXXII, 1033-1047.
- LACHICA , M.; RECALDE, L. y ESTEBAN, E. 1965. Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín. An. Edaf. y Agrobiol., XXIV, 589-610.
- LAUCHLI, A. 1976. Symplasmic transport and ion release to the xylem. En: Transport and Transfer Processes in Plants I.F. Wardlaw and J.B. Passioura (Eds). Academic Press . New York. p. 101.
- LAU, O.L.W.; JOHN, W.y YANG, S.F. 1978. Inactivity of oxidation products of indole- 3 - acetic acid on ethylene production on mung bean hypocotyls. Plant Physiol., 61, 68-71.
- LAWRIE, A.C. y WHEELER, C.T. 1975. Nitrogen fixation in the root nodules of Vicia faba, L. in relation to the assimilation of carbon. I. Plant growth and metabolism of photosynthetic assimilates. New Phytologist, 74, 429-436.
- LEA, P. J.; AWONAIKE, K.O.; CULLIMORE, J.V.y MIFLIN, B.J. 1982. The role of ammonia assimilatory enzymes during nitrogen fixation in root nodules. Israel Journal of Botany , 31, 140-154.

- LEA, P.J. y MIFLIN, B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. The Biochemistry of Plants. Vol. 5. Academic Press. Inc. pp. 569-607.
- LEE, K.Y. ; PAN, S.S.; ERIKSON, R. y NASON, A. 1974. Involvement of molybdenum and iron in the in vitro assembly of assimilatory nitrate reductase utilizing Neurospora mutant nit-1. J. Biol. Chem., 249, 3941-3952.
- LEOPOLD, A.C. 1977. Modification of growth regulatory action with inorganic solutes. En: Plant Growth Regulators, Chemical Activity, Plant Responses and Economic Potential. C.A. Stutte, ed. pp. 33-41. Adv. Chem. Ser. 159, Amer. Chem. Soc. Washington.
- LEOPOLD, A.C. y KRIEDEMANN, P.E. 1978. Plant Growth and Development. Ed. by Melvin, S. Fuller and Paul Licht, Second edition.
- LEPO, J.E.; HICKOK, R.E.; CANTRELL, M.A.; RUSSELL, S.A. y EVANS, H.J. 1981. Reversible hydrogen uptake-deficient mutants of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 146, 614-20.
- LIEBERMAN, M. y KUNISHI, A.T. 1970. Thoughts on the role of ethylene in plant growth and development. En: Plant Growth Substances (D.J. Carr, ed.). pp. 549-560. Springer-Verlag, New York.
- LIGERO, F.; OLIVARES, J.; LLUCH, C. y RECALDE, L. 1981 a. Desprendimiento de etileno por plantas de alfalfa (Medicago sativa, L.) noduladas y no noduladas. IV Reunión, Sociedad Española de Fisiología Vegetal, Salamanca, 1- 3 Octubre 1981. 190-191.
- LIGERO, F.; LLUCH, C. y RECALDE, L. 1981 b. Efecto de la fertilización nitrogenada y azufrada sobre el crecimiento, superficie foliar y contenido de N, P, K, Ca y Mg, en hojas de plantas de judía, (Phaseolus vulgaris, L.). Ann. Edaf. y Agrobiol., XL (7-8), 1269-1280.
- LIGERO, F. y LLUCH, C. 1982. Macronutrient content in leaves of beans plants (Phaseolus vulgaris, L.) grown with different rates of N/S as fertilizer. Plant and Soil, 65, 421-424.
- LIEBERMAN, M.; KUNISHI, A.T.; MAPSON, L.W. y WARDALE, D.A. 1966. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. Plant Physiology, 41, 376-382.
- LIN, W.H. y KAO, Ch. H. 1980. Factors affecting "in vivo" nitrate reductase activity in triticale. Physiol. Plant, 48 (3), 361-364.

- LIPS, H.; ROTH-BEJERANO, N. 1969. Light and hormones: inter changeability in the induction of nitrate-reductase. Science, 166, 109.
- LITTLER, J.W. y PRICE, M.J. 1967. Correction of sulphur deficiency in lucerne in the Warwick district, Queensland. Q.J. Agric. Anim. Sci., 24, 159-71.
- LJONES, T. y BURRIS, R.H. 1978. Nitrogenase : The reaction between the Fe-protein and bathophenanthrolinedisulfonate as a probe for interactions with Mg-ATP. Biochemis try, 17, 1866-1872.
- LJUNGGREN, H. 1969. Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous root hairs. Physiol. Plant Suppl. 5, 84.
- LJUNGGREN, H. y FÄHRAEUS, G. 1959. Effect of Rhizobium polysaccharide on the formation of polygalacturonase in lucerne and clover. Nature, 183, 1578-79.
- LLUCH, C.; CAMPOS, J.A. y LIGERO, F. 1983. Effect of nitrogen and sulphur fertilizers and seed inoculation with Rhizobium phaseoli on the N/S relationship in bean (Phaseolus vulgaris, L). J. of Plant Nutrition , 6 (12), 1033-1042.
- LLUCH, C.; CAMPOS, J.A. y LIGERO, F. 1984. Efecto del azufre, nitrógeno y Rhizobium sobre la cosecha, nodulación y contenido de nutrientes en Phaseolus vulgaris, L. Ann. Edaf. y Agrobiol. En prensa.
- LLUCH, C.; GOMEZ, M. y OLIVARES, J. 1976. Efecto de la utilización de azufre como fertilizante por vía foliar en judía. Anal. Edaf. y Agrobiol. XXX (5-6), 567-79.
- LLUCH, C.; GOMEZ, M. y OLIVARES, J. 1979. Efecto de la fertilización de soja con distintas formas de azufre. Ann. Edaf. y Agrobiol. XVIII (1-2). 197-205.
- LLUCH, C.; GOMEZ, M. y OLIVARES, J. 1982. The effect of the fertilization leguminous plants with sulphur on ethylene production by roots and Rhizobium nodulation. Agrochimica. XXVI (1), 79-86.
- LLUCH, C. y OLIVARES, J. 1976. Evolución de las actividades sulfooxidantes, amonificantes y nitrificantes en un suelo pardo rojo calizo, fertilizado con azufre. Agrochimica. XX (1), 93-100.
- LONG, S.R.; MEADE, H.M. y AUSUBEL, F.M. 1981. The use of the transposon mutagenesis in the molecular genetic analysis of symbiotic nitrogen fixation. Microbiology.

- LONERAGAN, J.F. 1975. The availability and absorption of trace elements in soil-plant systems and their relation to movement and concentration of trace elements in plants. En: D.J.D. Nicholas and A.R. Egan: Trace elements in - Soil - Plant Animal Systems, p. 109-134. Academic Press London.
- LOSADA, M.; HERRERA, J.; MALDONADO, J.M. y PANEQUE, A. 1973. Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant Sci. Letters, 1, 31.
- MAIER, R.J. y BRILL, W.J. 1978. Mutant strains of Rhizobium japonicum with increased ability to fix nitrogen for soybean. Science, 201, 448-450.
- MAIER, R.J.; CAMPBELL, N.E.R.; HANUS, F.S.; SIMPSON, F. B.; RUSSELL, S.A. y EVANS, H.J. 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living Rhizobium japonicum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3258-62.
- MANHART, J.S. y WONG, P.P. 1980. Nitrate effect on nitrogen fixation (acetylene reduction). Plant Physiol., 65, 502-505.
- MARQUARD, R.; KUHN, H. y LINSER, H. 1968. The effect of the sulphur nutrition on the synthesis of mustard oils. Pflanzenernähr Bodenk. , 121 , 221-230.
- MARTINEZ-MOLINA, E.; MORALES, U.M. y HUBBELL, D.H. 1979. Hydrolytic enzyme production by Rhizobium. Appl. Environ. Microbiol., 38, 1186-88.
- MARTINEZ-MOLINA, E. y OLIVARES, J. 1982. A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of Medicago sativa by Rhizobium meliloti. J. Appl. Bacteriol. 52, 453-455.
- MARWAH, R.S. y JULIANO, B.O. 1976. Phytochrome, nitrate movement and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. Plant Physiol., 55, 954-959.
- MASSEY, V. y HEMMERICH, P. 1978. Photoreduction of flavoproteins and other biological compounds catalyzed by deazaflavins. Biochemistry , 17, 9-15.
- MATSUMATO, H. ; WAKIUCHI, N. y TAKAHASHI, E. 1971. Changes in starch synthetase activity of cucumber leaves during ammonium toxicity. Physiol. Plant , 24, 102-110.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. y YAMAMOTO, Y. 1977. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating - soybean plants. Plant Cell Physiol., 18, 353- 359.

- MAYNARD, D.N. 1979. Nutritional disorders of vegetable crops : A review. *Journal of Plant Nutrition*, 1, 1-23.
- MAYNARD, D.N. y BARKER, A.V. 1969. Studies in the tolerance of plants to ammonium nutrition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94, 235-239.
- Mc COMB, J.A.; ELLIOTT, J. y DILWORTH, M.J. 1975. Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture . *Nature* , 256 , 409.
- Mc GREGOR, C.H.; SCHNAITMAN, C.A.; NORMANSELL, D.E. y HODGINS, M.G. 1974. Purification and properties of nitrate reductase from Escherichia coli, K12. *J. Biol. Chem.* , 249, 5321 - 5332.
- MCKENNA, C.E.; MACKENNA, M.C. y HIGA, M.T. 1976. Chemical probes of nitrogenase. 1. Cyclopropene, Nitrogenase-catalyzed reduction to propene and cyclopropane. *J. Am. Chem. Soc.*, 98 , 4657.
- MEADE, H.M. y SIGNER, E.R. 1977. Genetic mapping of Rhizobium meliloti. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 , 2076-2078.
- MEJIAS, J.A. 1983. Estudio del ensayo "in situ" y del efecto de la fuente de nitrógeno en la actividad N₂asa de la hoja de soja (Glycine max). Memoria de Licenciatura. Universidad de Sevilla.
- MEINERS, C.R.; DERISE, N.L.; LAU, M.C.; CREWS, M.G.; RITCHIEY, S.J. y MURPHY, E.W. 1976. The content of nine mineral elements in raw and cooked ^mature dry legumes. *J. Agric. Fd. Chem.* , 24, 1126 - 1130.
- MEIRI, A.; KAMBUROFF, J. y POLJAKOFF-MAYBER, A. 1971. Response of beans plants to sodium chloride and sodium sulphate salinization. *Ann. Bot.*, 35 , 837-847.
- MENDEL, R.R. y MÜLLER, A.J. 1978. Reconstitution of NADH-nitrate reductase in vitro from nitrate-reductase-deficient Nicotiana tabacum mutants. *Mol. Gen. Genet.* 161, 77-80.
- MENGEL, K. y KIRKBY, E.A. 1978. Principles of plant-nutrition. Bern; 1st potash Inst. pp. 593.
- MENGEL, K. y KIRKBY, E.A. 1982. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute Ed. Switzerland, 665 pp.
- MENNES, A.M. 1973. Indole- 3 - acetic acid oxidase activity in root nodules and roots of Lupinus luteus, L. Purification and kinetics of the enzyme. *Acta. Bot. Neerl.*, 22 , 694-705.

- MERRICH, M.J. 1982. A new model for nitrogen control. *Nature*, 297, 362-363.
- MICHAEL, G.; MARTIN, P. y OWASSIA, I. 1970. The uptake of ammonium and nitrate from labelled ammonium nitrate in relation to the carbohydrate supply of the roots. En: E.A. Kirkby : Nitrogen Nutrition of the Plants Univ. of Leeds, p. 22- 29.
- MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* , 15, 873-885.
- MILLERD, A. 1975. Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*; 26, 53-72.
- MILLS, H.A. y JONES, J.B. 1979. Nutrient deficiencies and toxicities in plants : nitrogen. *Journal of Plant Nutrition* . 1 (2), 101-122.
- MINCHIN, F.R. y PATE, J.S. 1973. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *Journal of Experimental Botany* , : 24, 259-271.
- MINCHIN, F.R. y PATE, J.S. 1974. Diurnal functioning of the legume root nodule. *Journal of Experimental Botany* , 25 295- 308.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H. y RAWSTHORNE, S. 1981. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant, cell and Environment* , 4, 5-26.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. y NEVES, M.C.P. 1981. Nitrogen nutrition of cowpeas (*Vigna unguiculata*) : effects of timing of inorganic nitrogen applications on nodulation, plant growth and seed yield. *Trop. Agric. (Trinidad)*: 58, 1-12.
- MOLLE, K.G. y JESSEN, T. 1968. Increasing amounts of nitrogen to spring cereals grown on low areas 1960-67. *T. Planteaul.* 72, 489-502.
- MOORE, D.P. 1974. Physiological effects of pH in roots. En: E.W. Carson. *The Plant Root and Its Environment*, p.135-151. Univ. Press Virginia. Charlottesville.
- MORRE, D.J. y MOLLENHAUER, H.M. 1974. Infection by *Rhizobium* of legume roots. En: *Dinamics Aspects of Plant Ultrastructure* (A.W. Robards, ed.) pp. 84-137. McGraw-Hill, New York.
- MOTHES, K. 1961. Accumulation of α -aminobutyric acid in leaf tissue under the influence of kinetin. *Can. J. Botany*, 39, 1785.

- MOZES, R. y ALTMAN, A. 1977. Characterist of root-to-shoot transport of cytokinin 6-benzylaminopurine in intact seedlings of Citrus aurantium. Physiol. Plant , 39, 225-232.
- MULDER, E.G.; BOXMA, R. y VAN VEEN, W.L. 1959. Nitrate reduction in plant tissues. Plant Soil, 10 , 335-355.
- MULVANEY, R.L. y BREMNER, J.M. 1978. Use of p-benzoquinone and hidroquinone for retardation of urea hydrolysis in soils. Soil Biol. Biochem., 10, 297-302.
- MUNNS, D.N. 1977. Mineral nutrition and the legume symbiosis. En: A treatise on Dinitrogen Fixation. IV. Eds. R.W. F. Hardy and A.H. Gibson. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- MUNNS, D.N. 1968 a. Nodulation of Medicago sativa in solution culture II. Compensating effects of nitrate of prior nodulation. Plant Soil , 28, 246 - 57.
- MUNNS, D.N. 1968 b. Nodulation of Medicago sativa in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. Plant Soil , 29, 33-47.
- MUNNS, D.N. 1968 c. Nodulation of Medicago sativa in solution culture. IV. Effects of indole -3-acetate in relation to acidity and nitrate. Plant Soil , 29, 257- 61.
- NAPOLI, C. y ALBERSHEIM, P. 1980 a. Infection and nodulation of clover by nonmotile Rhizobium trifolii. J. Bacteriol. 141, 979 - 80.
- NAPOLI, C. y ALBERSHEIM, P. 1980 b. Rhizobium leguminosarum mutants incapable of normal extracelular polysaccharide production. J. Bacteriol., 141, 1454 - 56.
- NAPOLI, C. y HUBBELL, D.H. 1975. Ultraestructure of Rhizobium-induced infection threads in clover root hairs. App. Microbiol.; 30, 1003 - 9.
- NAPOLI, C.; SANDERS, R.y ALBERSHEIM, P. 1979. Host-symbiont interactions : recognizing Rhizobium. En: Proceedings of the Steenbook-Kettering International Symp. on Nitrogen Fixation. (W. H. Orme-Johnson and W.E. Newton, eds.). Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
- NEWCOMB, E.H. y TANDON, S.R. 1981. Uninfected cells of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. Science , 212, 1394 - 1396.

- NEWCOMB, W. 1976. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in Pisum sativum nodules. *Can. J. Bot.*, 54, 2163 - 2186.
- NEWCOMB, W. 1979. Control of morphogenesis and differentiation of pea root nodules. En: Proceedings of the Steenbock-Kettering International Symp. on Nitrogen Fixation (W.H. Orme-Johnson and W.E. Newton, eds.). Univ. Park, Press. Baltimore, Maryland.
- NEWCOMB, W.; SIPPPELL, D. y PETERSON, R.L. 1978. The early morphogenesis of Glycine max and Pisum sativum root nodules. *Can. J. Bot.*, 57, 2603 - 16.
- NIELSEN, H.M. y LYSGAARD, C.P. 1956. Relationship between root and top growth and organic root reserves in lucerne. *Arsskrift Kong. Veter, og. Land. Hogskole.*
- NISSEN, P. 1974. Uptake mechanisms: inorganic and organic. *Ann Rev. Plant Physiol.*, 25, 53-79.
- NOVOA, R.; LOOMIS, R.S. y MCDERMITT, D.K. 1981. Integration of nitrate and ammonium assimilation in higher plants. En: Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen (J.M. Lyons, R.C. Valentine, D.A. Phillips, D.W. Rains, and R.C. Huffaker, eds.). Plenum Publ. Co. 1981.
- NUTMAN, P.S. 1952. Studies on the physiology of nodule formation III. Experiments on the excision of root tips and nodules. *Ann. Bot.*, 16, 79-101.
- NUTMAN, P.S. 1965. Origin and development physiology of root nodules. En: *Encyclopedie of Plant Physiology.* (W. Ruhland ed.) Springer-Verlag. Berlin and New York. pp. 1355-1379.
- OAKS, A.; ASLAM, M. y BOESEL, I. 1977. Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 59, 391-394.
- OGHOGHORIE, C.G.O. 1971. The physiology of the field pea-Rhizobium symbiosis in the presence and absence of nitrate. Ph D. Thesis. Queen's Univ. Belfast, Northern Ireland.
- OGHOGHORIE, C.G.O. y PATE, J.S. 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (Pisum arvense L) Technique for measurement and evaluation in physiological terms. *Plant Soil.* Spec. vol. Int. Biol. Programme, 1970. Tech. Meet. Biol. nitrogen fixation, ed. T.A. Lie, E.G. Mulder, pp. 185-202.

- OHLROGGE, A.J. 1960. Mineral nutrition of soybeans. *Adv. Agrom.*, 12, 230 - 263.
- OKE, O.L. 1969. Sulphur nutrition of legumes. *Expl. Agric.*, 5, 111 - 116.
- OLDAY, F.C.; BARKER, A.V. y MAYNARD, D.N. 1976. Nitrate metabolism in pea. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101, 219.
- OLIVARES, J. 1977. Algunos aspectos de la asociación Rhizobium - leguminosa : Especificidad e Infectividad. En : Aspectos Actuales de las Relaciones Huesped-Parásito e Intermicrobianas. Ed. A. Portolés y F. Baquero. *Sp. Es. Microbiol.*: 305 - 314.
- OLIVARES, J.; BEDMAR, E.J. y CASADESUS, J. 1979. La fijación biológica de nitrógeno. Importancia y perspectivas. *Anal Edaf. y Agrobiol.* XXXVIII, 1457 - 1466.
- OLIVARES, J.; CASADESUS, T. y BEDMAR, E.J. 1980. Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti - strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 967 - 970.
- OLIVARES, J.; BEDMAR, E.J. y MARTINEZ-MOLINA, E. 1984. Infectivity of Rhizobium meliloti as afected by extracellular polysaccharides. *J. Appl. Bacteriol.*, 56, en prensa.
- OLSON, R.A. 1979. Isotope studies on soil and fertilizer nitrogen. En : Isotopes and Radiation in Research on Soil Plant Relationships. International Atomic Energy Agency 235/48. pp. 3 - 32.
- OREBAMJO, T.O. y STEWART, G.R. 1975. Ammonium inactivation of nitrate reductase in Lemna minor. *Planta*, 122, 37.
- ORME-JOHNSON, W.H.; DAVIS, L.C.; HENZL, M.T.; AVERILL, B.A. ORME-JOHNSON, N.R.; MUNCK, E. y ZIMMERMAN, R. 1977. Components and pathways in biological nitrogen fixation. En : Recent Developments in Nitrogen Fixation. (W. Newton, J.R. Postgate and C. Rodríguez-Barrueco, eds.) pp. 165-172. North-Holland. Amsterdam.
- ORME-JOHNSON, W.H.; MUNCK, E.; ZIMMERMAN, R.; BRILL, W.J.; SHAH, V.K.; RAWLINGS, J.; HENZL, M.I.; AVERILL, B.A. y ORME-JOHNSON, N.R. 1978. On the metal centers in nitrogenase. En: Mechanisms of Oxidising Enzymes. (T.P. Singer and R.N. Oudarza, eds.) pp. 165-172. North Holland. Amsterdam.
- OSBORNE, T.B. 1924. The Vegetable Proteins. En: The Vegetable Proteins. 2nd edition. Longmans, Green, Co. New York.

- OW, D.W. y AUSUBEL, F.M. 1983. Regulation of nitrogen metabolism genes by nif A gene product in Klebsiella pneumoniae. Nature, 301, 307-313.
- PAAU, A.S.; LEPS, W.T. y BRILL, W.J. 1981. . Agglutinin from alfalfa necessary for binding and nodulation by Rhizobium meliloti. Science. 213, 1513 - 1515.
- PAGAN, J.D.; CHILD, J.J.; SCOWCROFT, W.R. y GIBSON, A.M. 1975. Nitrogen fixation by Rhizobium cultured in a defined medium. Nature , 256, 406 - 407.
- PAHWA, K. y DOGRA, R.C. 1981. Hydrogen recycling system in mung bean (Vigna radiata)-Rhizobium in relation to nitrogen fixation. Arch. Microbiol., 129, 380 - 83.
- PANEQUE, A.; DEL CAMPO, F.F.; RAMIREZ, J.M. y LOSADA, M. 1965. Flavine nucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim. Biophys. Acta., 109, 79-92.
- PANKHURST, C.E. y SCHWINGHAMER, E.A. 1974. Adenine requirement for nodulation of pea by an auxotrophic mutant of Rhizobium leguminosarum. Arch. Microbiol., 100, 219- 238.
- PANKHURST, C.E. y SPRENT, J.I. 1975. Surface features of soy bean nodules. Protoplasma , 85, 85-98.
- PATE, J.S. 1958. Studies of the growth substances of legume nodules using paper chromatography. Australian Journal of Biological Sciences, II, 516 - 528.
- PATE, J.S. 1962. Root-exudation studies on the exchange of C14 labelled organic substances between the roots and shoot of the nodulated legume. Plant and Soil , 17, 333-356.
- PATE, J.S. 1965. Roots and organs of assimilation of sulfate. Science, 149, 547 - 548.
- PATE, J.S. 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem., 5, 109-119.
- PATE, J.S. 1976 a. Transport in symbiotic systems fixing nitrogen. En: Encyl. Plant Physiol. Transport in Plants II. Part B, Tissues and Organs (U. Luttge and M.G Pitman, eds). pp. 278-303 . Springer -Verlag. Berlin and New York.
- PATE, J.S. 1976 b. Nutrients and metabolites of fluids recovered from xylem and phloem : Significance in relation to long distance transport in plants. En: Transport and Transfer Processes in Plants, ed. I.F. Wardlew, J.B. Pas sioura, pp. 253-345. CSIRO Conf. Canberra. Australia.

- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutos. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 313-340.
- PATE, J.S. y DART, P.J. 1961. Nodulation studies in legumes. IV. The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant Soil*, 15, 329-346.
- PATE, J.S. y GUNNING, B.E.S. 1972. Transfer cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, 173-196.
- PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. y LEWIS, D.A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of a legume, studied by a phloem bleeding technique. *Planta*, 122, 11-26.
- PATERSON, J. y LARUE, T. 1981. Alcohol and acetaldehyde support acetylene reduction by soybean bacteroids. *Pl. Physiol.*, 67 (Suppl.) 78.
- PEACH, K. y TRACEY, M.V. 1956. Modern method of plant analysis. Springer Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- PEGG, G.F. 1976. The involvement of ethylene in plant pathogenesis. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Physiological Plant Pathology, Vol. 4, Springer-Verlag, Heidelberg, 582-591.
- PETERSON, R.B. y BURRIS, R.H. 1978. Hydrogen metabolism in isolated heterocysts of Anabaena 7120. *Arch. Microbiol.*, 116, 125-32.
- PHILLIPS, D.A.; NEWELL, K.D.; HASEELL, S.A. y FELLING, C.E. 1976. The effect of CO₂ enrichment on root nodule development and symbiotic N₂ reduction in Pisum sativum, L. *Am. J. Bot.*, 63, 356-362.
- PHILLIPS, D.A. y TORREY, J.C. 1970. Cytokinin production by Rhizobium japonicum. *Physiol. Plant*, 23, 1057-1063.
- PHILLIS, D.A. y TORREY, J.G. 1972. Studies on cytokinin production by Rhizobium. *Plant Physiol.*, 49, 11-15.
- PILL, W.G. y LAMBERT, V.N. 1977. Effects of NH₄ and NO₃ nutrition with and without pH adjustments on tomato growth, ion composition and water relations. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 102, 78-81.
- PITMAN, M.G. 1977. Ion transport into the xylem. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 71.

- PLANQUE, K.; DE VRIES, G.E. y KIJNE, J.W. 1978. The relationship between nitrogenase and glutamine synthetase, in bacteroids of Rhizobium leguminosarum of various ages. J. Gen. Microbiol., 106, 173-178.
- POPE, D.G. 1977. Relationships between hydroxyproline-containing proteins secreted into the cell wall and medium by suspension-cultured Acer pseudopla. Plant Phys., 60, 150.
- PORTIS, A.R. y HELDT, H.W. 1976. Light dependent changes in the Mg^{++} concentration in the stroma in relation to the Mg^{++} dependency of CO_2 fixation in intact chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta , 449, 434-446.
- POSTGATE, J. 1978. Nitrogen Fixation. Edward Arnold. Londres.
- POZO, MANUEL DEL 1977. La Alfalfa; su Cultivo y Aprovechamiento. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- PRAKASH, R.K.; HOOYKAAS, P.J.J.; LEDEBOER, A.M.; KIJNE, J.; SCHILPEROOT, R.A.; NUTI, M.P.; LEPIDI, A.A.; CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIOT, J.S. y DENARIE, J. 1979. Detection, isolation, and characterization of large plasmids in Rhizobium. En: Proceedings of the Steenbock Kettering International Symp. on Nitrogen Fixation. W.H. Orme-Johnson and W.E. Newton, Eds. Univ. Park Press Baltimore, Maryland.
- PRATT, H.K. y GOESCHL, J.D. 1969. Physiological roles of ethylene in plants. Annual Review of Plant Physiology , 20, 1969.
- PULL, S.P.; PUEPPKE, J.G.; HYMOWITZ, T. y ORF, J.H. 1978. Soybean lines lacking the 120.000 -Dalton seed lectin. Science, 200, 1277 - 1279.
- PUMPHREY, F.V. y MOORE, D.P. 1965. Relation N/S in leguminous plants. Agronomy Journal , 57 (3), 237-239.
- PUPPO, A. y RIGAUD, J. 1975. Indole-3- acetic acid (IAA) oxidation by leghemoglobin from soybean nodules. Physiol. Plant , 35, 181 - 185.
- PUPPO, A.; RIGAUD, J. y BARTHE, PH. 1974. Sur la présence de cytokinines dans les nodules de Phaseolus vulgaris, L. C.R. Acad. Sci. (París). Serv. D. 279, 2029-2032.
- RABIE, R.K. 1981. Nitrogen nutrition of legumes with special concern to seed yield production. Journal of Plant Nutrition , 4 (2), 175 - 194.

- RABIE, R.K.; ARIMA, Y. y KUMAZAWA, K. 1979. Growth, nodule activity and yield of soybeans as affected by the form and application method of combined nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 417 - 427.
- RABIE, R.K.; ARIMA, Y. y KUMAZAWA, K. 1980. Effect of combined nitrogen on the distribution pattern of photosynthetic assimilates in nodulated soybean plant as revealed by ^{14}C . *Soil Sci. Plant Nutr.*, 27, 106-109.
- RACHIE, K.O. y ROBERTS, L.M. 1974. Grain legumes of the low land tropics. *Adv. Agron.*, 26, 2- 132.
- RADIN, J.W. 1973. In vivo assay of nitrate reductase in cotton leafdises. Effect of oxygen and ammonium. *Plant Physiol.*, 51. 332-336.
- RADIN, J.W. 1977. Amino acids interactions in the regulation of nitrate reductase induction in cotton root tips. *Plant Physiol.*; 60, 467.
- RADIN, J.W. 1978. A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves. *Plant Sci. Letters*, 13, 21-25.
- RADIN, J.W. y LOOMIS, R.S. 1969. Ethylene and carbon dioxide in the growth and development of cultured radish roots. *Plant Physiol.*, 44, 1584 - 1589.
- RADIN, J.W.; PARKER, L.L. y SELL, C.R. 1978. Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton - roots. *Plant Physiol.*, 62, 550 - 53.
- RADIN, J.W.; SELL, C.R. y JORDAN, W.R. 1975. Physiological significance of the "in vivo" assay for nitrate reductase in cotton seedings. *Crop. Sci.*, 15, 710 - 713.
- RADLEY, M. 1961. Gibberellin-like substances in plants. *Nature*, 191, 684 - 685.
- RAMIREZ, J.M.; DEL CAMPO, F.F.; PANEQUE, A. y LOSADA, M. 1964. Mechanis of nitrate reduction in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 297-302.
- RANDALL, D.D.; RUSSELL, W.J. y JOHNSON, D.R. 1978. Nodule nitrate reductase as a source of reduced nitrogen in soy bean, *Glycine max.* *Physiol. Plant*, 44, 325-328.
- RAO, K.B. y DAS, N.B. 1967. Effect of sulphur on methionine and cystine content of pea. *Indian J. Agric. Sci.*, 37, 390 - 395.
- RAO, K.P. y RAINS, D.W. 1976. Nitrate absortion by barley. *Plant Physiol.*, 57, 55 - 58.

- RAUSER, W.E. y HORTON, R.F. 1975. Rapid effects of indoleacetic acid and ethylene on the growth of intact pea roots. *Plant Physiol.* , 55, 443 - 447.
- RECALDE-MANRIQUE, L. y DIAZ-MIGUEL, M. 1981. Evolution of ethylene by sulphur dust addition. *Physiol. Plant* : 53, 462 - 467.
- RECALDE-MANRIQUE, L. y RECALDE, L. 1979. Efecto comparativo de las aplicaciones foliares de azufre elemental pulverizado y de ethrel. *Anal. Edaf. y Agrobiol.*, XXXVIII , 2105 - 2115.
- RENDING, V.V. y Mc COMB, E.A. 1959. Effect of nutritional stress on plant composition. I. The interaction of added nitrogen with varying sulfur supply. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 23, 377 - 380.
- RENDING, V.V.; OPUTA, C. y Mc COMB, E.A. 1976. Effects of sulphur deficiency on non-protein nitrogen, soluble sugars and N/S ratios in young corn plants. *Plant and Soil* 44, 423 - 437.
- RHODES, D.; SIMS, A.P. y FOLKES, B.F. 1980. Phathway of ammonia assimilation in illuminated Lenna minor. *Phytochemistry*, 19, 357 - 365.
- RICHARDS, I.R. 1979. Response of tropical crops to fertilizer under farmers conditions-analysis of results of the FAO fertilizer programe. *Phosph. Agric.* , 76, 147-156.
- RIEHM, H. y QUELLMALZ, E. 1959. The determination of plant nutrients in rain water and in air and their importance for the agriculture. En: H. Riehm : 100 Jahre Staatl. Laudw. Versuchsund Forschungsanstalf Augustenberg. p. 171-183.
- RIGAUD, J. 1976. Effect des nitrates sur la fixation d'azote par les nodules de Haricot (Phaseolus vulgaris, L.). *Physiol. Veg.*, 14 (2), 297- 308.
- RIGAUD, J.; BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L. y DANIEL, R.M. 1973. Nitrate-dependent anaerobic acetylene reduction - and nitrogen fixation by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, 77, 137 - 144.
- RIGAUD, J. y PUPPO, A. 1975. Indole- 3 -acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, 88, 223-228.
- RILEY, D. y BARBER, S.A. 1971. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root induced pH changes at the root-soil interface. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 35, 301 - 306.

- RIVERA-ORTIZ, J.M. y BURRIS, R.H. 1975. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *J. Bacteriol.* 123, 537 - 545.
- ROBERTSON, J.G. y FARNDEN, K.J.F. 1980. The ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. En: *Amino Acids and Derivatives*, ed. B.J. Miñin, vol. 5, of *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* ed. P.K. Stumpf, E.E. Coun. New York: Academic. In. Press.
- ROBERTSON, J.G.; FARNDEN, K.J.F.; WARBURTON, M.P. y BANKS, J.M. 1975 a. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. *Aust. J. Plant Physiol.* , 2 265 - 272.
- ROBERTSON, J.G.; LYTTLETON, P.; BULLIVANT, S. y GRAYSTON, G.F. 1978. Membranes in lupin root nodules I. The role of Golgi bodies in biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell Sci.*, 30, 129 - 149.
- ROBERTSON, J.G.; WARBURTON, M.P. y FARNDEN, K.J.F. 1975 b. Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. *FEBS Lett.*, 55, 33 - 37.
- ROBIN, P.; BLAYAC, D. y SALSAC, L. 1979. Influence de l'alimentation nitrique sur la teneur en nitrate et l'activité nitrate reductase des racines et des feuilles de plantules de Maïs. *Physiol. Veg.*, 17, (1), 55 - 66.
- ROBINSON, A. 1975. Nitrogen fertilization. *Proc. Fertil. Soc.* , 147, 4 - 19.
- ROBSON, A.D. 1979. Mineral nutrients limiting nitrogen fixation in legumes. En : *Mineral Nutrition of Legumes in Tropical and Subtropical Soils*. Eds. C.S. Andrew and E.J. Kamprath. CSIRO, Melbourne, Australia.
- RONSON, C.W. y PRIMROSE, S.B. 1979 . Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii: identification and symbiotic properties of mutants. *J. Gen. Microbiol.*, 112 ,77-88.
- ROBSON, R.L. 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from Azotobacter chroococcum. *Biochem. J.*; 181, 569 - 575.
- ROSENBERG, Ch.; BOISTARD, P.; DÉNARIÉ, J. y CASSE-DELBART, F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. *Mol. Gen. Genet.*, 184 , 326 - 333.

- ROUTCHENKO, W. 1967. Appreciation des conditions de la nutrition mineral des plants bassées sur l'analyse des sucres extraits des tissus conducteurs. Ann. Agron., 18, 316 - 402.
- RUCKLIDGE, G.; NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J. 1976. Reconstitution in vitro of nitrate reductase from apoprotein of molybdenum-deficient spinach. Biochem. Soc. Trans., 4, 77 - 80.
- RUIZ-ARGUESO, T.; HANUS, J. y EVANS, H.J. 1978. Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of Rhizobium leguminosarum. Arch. Microbiol., 116, 113-18.
- RYLE, G.J.A.; ARNOTT, R.A. y POWELL, C.E. 1981. Distribution of dry weight between root and shoot in white clover dependent on N₂ fixation or utilizing abundant nitrate nitrogen. Plant and Soil, 60, 29 - 39.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. y GORDON, A.J. 1978. Effect of source of nitrogen on the growth of Fiskeby soybean: the carbon economy of whole plants. Ann. Bot., 42, 637 - 648.
- SALUNKHE, D.K.; SATHE, S.K. y REDDY, N.R. 1983. Legume Lipids. En: Chemistry and Biochemistry of Legumes. Edited by S.K. Arora. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi. 110 001.
- SANDERS, R.E.; CARLSON, R.W. y ALBERSHEIM, P. 1978. A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature, 271, 240 - 242.
- SARIC, M.R. 1981. Genetic specificity in relation to plant mineral nutrition. J. Plant. Nutr., 3 (5), 743 - 66.
- SARIC, Z.; MILIC, V. y HAZEM, T. 1978. Biosintesis of plant growth substances by some Rhizobium japonicum strains of various efficiency. J. Scientific Agricultural Research, 115, 29 - 41.
- SASSEVILLE, D.N. y MILLS, H.A. 1979. N form and concentration effect on reproductive development, growth and nitrogen content of southern peas. Journal of Plant Nutrition, 1 (3), 241 - 254.
- SAWHNEY, S.K.; NAIK, M.S. y NICHOLAS, D.J.D. 1978. Regulation of NADH supply for nitrate reduction in green plants via photosynthesis and mitochondrial respiration. Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 1209 - 1216.
- SAWHNEY, S.K. y NICHOLAS, D.J.D. 1975. Nitrite, hydroxylamine and sulfite reductases in wheat leaves. Phytochemistry, 14, 1499 - 1503.

- SCHARPF, H.C. y WEHRMANN, J. 1975. Importance of mineral nitrogen quantity in the soil profile at the beginning of the growth period for the N-application rate for winter wheat. Landw. Forchs. 32/I, Souderheft.: 100 - 114.
- SCHIFFMAN, J. y LOBEL, R. 1970. Haemoglobin determination - and its value as an early indication of peanut Rhizobium efficiency. Plant Soil, 33, 510 - 512.
- SCHMIDT, A. 1979. Photosynthetic assimilation of sulfur compounds. En: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Vol. 6. Photosynthesis II (M. Gibbs y E. Lafako eds). Springer-Verlag, Berlin, p. 481 - 496.
- SCHMIDT, E.L. 1979. Initiation of plant root-microbe interactions. Ann. Rev. Microbiol., 33, 355 - 76.
- SCHRADER, L.E. 1978. Uptake, accumulation, assimilation and transport of nitrogen in higher plants. Nitrogen Environ., 2, 101 - 41.
- SCHRADER, L.E.; CATALDO, D.A. y PETERSON, D.M. 1974. Use of protein in extraction and stabilization of nitrate reductase. Plant Physiol., 53, 688 - 690.
- SCHRADER, L.E.; RITENOUR, G.L.; EILRICH, G.L. y HAGEMAN, R. H. 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. Plant Physiol., 43, 930 - 940.
- SCHUBERT, K.R.; 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 - 11.
- SCHUBERT, K.R.; JENNINGS, N.T. y EVANS, H.J. 1978. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. Plant Physiol., 61, 398 - 401.
- SCHWENN, J.D. y TREBST, A. 1976. Photosynthetic sulfate reduction by chloroplast. En: The Intact Chloroplast. (J. Barber, ed). pp. 315 - 334. Elsevier, Amsterdam.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1977. Genetic aspects of nodulation and nitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation. R.W.F. Hardy and W.S. Silver eds. Section III. pp 577 - 622. Wiley. New York.
- SCOTT, D.B.; ROBERTSON, J.G. y FARNDEN, K.J.F. 1976. Ammonia assimilation in lupin nodules. Nature, 263, 703 - 708.
- SEMU, E. y HUME, D.J. 1979. Effects of inoculation and fertilizer N levels on N₂-fixation and yields of soybeans in Ontario. Can. J. Plant. Sci., 59, 1129 - 1137.

- SEQUEIRA, L. 1973. Hormone metabolism in diseased plants. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 24, 353 - 380.
- SHAH, V.K.; DAVIS, L.C. y BRILL, W.J. 1972. Nitrogenase. I Repression and derepression of the iron-molybdenum and iron proteins of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 256, 498 - 511.
- SHEAT, D.E.G.; FLETCHER, B.H. y STREET, H.E. 1959. Sulphur and nitrogen nutrition in white clover. *New Phytol.*, 58 128 - 141.
- SHUG, A.L.; HAMILTON, P.B. y WILSON, P.W. 1956. Hydrogenase and nitrogen fixation. En : *Inorganic Nitrogen Metabolism*, ed. W.D. McElroy, B. Glass, pp. 344-360. Baltimore : Johns Hopkins Press. 728 pp.
- SHUKLA, U.C.; DIXIT, M.L. y ARORA, S.K. 1983. Mineral nutrition. En: *Chemistry and Biochemistry of Legumes*. (Ed. by Arora, S.K.) Oxford and IBH Publishing Co. pp. 259.
- SIEGEL, L.M. 1975. Biochemistry of the sulphur cycle. En : *Metabolic Pathways*. (D.M. Greemberg, ed) 3rd ed. Vo. VII pp. 217 - 286. Academic Press. New York.
- SIK, T. y BARABAS, I. 1977. The correlation of nitrate reductase and nitrogenase in *Rhizobium* symbiosis. Pages , 365 - 373. En W. Newton, J.R. Postgate and C. Rodríguez Barrueco, eds. *Recent developments in nitrogen fixation*. Academic Press, London.
- SILVIUS, J.E.; INGLE, M. y BAER, C.H. 1975. Sulphur dioxide inhibition of photosynthesis in isolated spinach chloroplast. *Plant Physiol.*, 56 , 434 - 437.
- SLOGER, C.; BEZDICEK, D.; MILBERG, R.; BOOKERD, N. 1975. Seasonal and diurnal variations in N₂ (C₂ H₂)-fixing activity in field soybeans. En : *Nitrogen fixation by free living microorganism*. Stewart, W.D.P. ed. pp. 271-284 . London. Cambridge. Univ. Press.
- SMALL, J.G.; HOUGH, M.C.; CLARKE, B y GROBBELAAR, N. 1968. The effect of temperature on nodulation of whole plants and isolated roots of *Phaseolus vulgaris*, L. *S. Agr. J. Sci.*, 64 , 218 - 224.
- SMALL, J.G. y LEONARD, O.A. 1969. Translocation of C¹⁴ labelled photosynthate in nodulated legumes as influenced by nitrate nitrogen. *Am. J. Bot.*, 56 , 187 - 194.
- SMILEY, R.M. 1974. Rhizosphere pH as influenced by plants , soils and nitrogen fertilizers. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38 , 795 - 797.

- SMITH, B.E.; LOWE, D.J. y BRAY, R.C. 1972. Nitrogenese of Klebsiella pneumoniae. Biochem. J. , 130, 641 - 643.
- SMITH, F.W. y DOLBY, G.R. 1977. Derivation of diagnostic indices for assessing the sulphur status of Panicum maximum var. trichoglume. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 8, 221 - 240.
- SMITH, I.K. 1976. Characterization of sulfate transport in cultured tobacco cells. Plant Physiol., 58 , 358-362.
- SMITH, J.D. 1949. The concentration and distribution of haemoglobin in the root nodules of leguminous plants. Biochem. J., 44 , 591-598.
- SMITH, K.A. y DOWDELL, R.J. 1974. Field studies of the soil atmosphere I. Relationships between ethylene, oxygen , oxygen, soil moisture content, and temperature. J. Soil Sci., 25 , 217 - 230.
- SMITH, K.A. y ROBERTSON, P.D. 1971. Effect of ethylene on root extension of cereals. Nature London, 234, 148-149.
- SNELL, E.D. y SNELL, C.T. 1949. Colorimetric Methods of Analysis. D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York, pag. 804.
- SPENCER, K. 1978. Sulphur nutrition of clover : effects of plant age on the composition-yield relationship . Comun. in Soil Science and Plant Analysis., 9 (9), 883-895.
- SPENCER, K.; FRENEY, J.R. y JONES, M.B. 1978. Diagnosis of sulphur deficiency in plants. En : Plant Nutrition. Proceedings of the 8th International Colloquium on Plant - Analysis and Fertilizer Problemas New Zealand. pp. 507-513.
- SPENCER, K.; JONES, M.B. y FRENEY, J.R. 1977. Diagnostic indices for sulphur status. Aust. J. Agric. Res., 28, 401-412.
- SPRENT, J.I. 1971. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. New Phytol., 70, 9 - 17.
- SPRENT, J.I. 1979. Nitrogen fixation. En: Physiology and - Biochemistry of Drought Resistance in Plants. (ed. L.G. Paleg and D. Aspinall) Academic Press Sydney.
- SPRENT, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. Plant Cell and Environment, 3, 35 - 43.

- SPRENT, J.I. y BRADFORD, A.M. 1977. Nitrogen fixation in Vicia faba (field beans) as affected by population density, shading and its relationships with soil moisture. Journal of Agricultural Science, 88, 303 - 310.
- SRIVASTAVA, H.S. 1974. "In vivo" activity of nitrate reductase in maize seedlings. Indian J. Biochem. Biophys. 11, 230.
- SRIVASTAVA, H.S. 1980. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Phytochemistry, 19, 725 - 733.
- STACEY, G. y BRILL, W.J. 1982. Nitrogen fixing bacteria colonization of the rhizosphere and roots. En: Phytopathogenic Prokariotes. (M.S. Mount and G.H. Lacy, eds.). pp. 225-247. Academic Press.
- STACEY, G.; PAAU, A.S. y BRILL, W.J. 1980. Host recognition in the Rhizobium-soybean symbiosis. Plant Physiol., 66, 609-14.
- STEINER, A.A. 1961. A universal method for preparing nutrient solution of a certain desired composition. Plant and Soil, XV, 134 - 154.
- STEWART, B.A. 1966. Nitrogen-sulphur relationships in plants tissues, plant residues, and soil organic matter. En: Intl. Soc. Sci. Trans. (Comm. II. and IV) Aberdeen, Scotland.
- STEWART, B.A. y PORTER, L.K. 1969. Nitrogen-sulphur relationships in wheat (Triticum aestivum, L.), corn (Zea mays) and beans (Phaseolus vulgaris). Agronomy Journal, 61, 267-71.
- STIEFFEL, E.J. 1973. Proposed molecular mechanism for the action of molybdenum in enzymes: coupled proton and electron transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 70, 988-992.
- STRRETER, J.G. 1978. Effect of N starvation of soybean plants at various stages of growth on seed yield and N concentration of plant parts at maturity. Agron. J., 70, 74-76.
- STREETER, J.G. 1980. Carbohydrates in soybean nodules II. Distribution of compounds in seedlings during the onset of nitrogen fixation. Plant Physiol.; 66, 471 - 476.
- STREETER, J.G. y BOSLER, M.E. 1972. Comparison of in vitro assays for nitrate reductase in soybean leaves. Plant Physiol., 49, 448 - 450.
- STREICHER, S. y VALENTINE, R.C. 1977. The genetic basis of dinitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section III. Biology - (Hardy, R.W.F. and Silver, W.S., eds). p. 623- John Wiley, New York.

- SUDHAKARA, C. y MEHTA, B.V. 1970. Response of alfalfa (Medicago sativa, L.) to sulphur application on loamy sand - soil of anand. Indian J. Agric. Sci.; 40, (5) , 452-456.
- SUELTER, C.H. 1970. Enzymes activated by monovalent cations. Science, 148, 789 - 795.
- SYONO, K.; NEWCOMB, W. y TORREY, J.G. 1976. Cytokinin production in relation to the development of pea root nodule. Can. J. Bot. ; 54 , 2155 - 2162.
- TAJIMA, S.; YATAZAWA, M. y YAMAMOTO, Y. 1977. Allantoin production and its utilization in relation to nodule formation in soybeans. Soil Science and Plant Nutrition, 23, 225 - 236.
- TANADA, T. 1978. Boron -key element in the actions of phytochrome and gravity. Planta ; 143, 109 - 111.
- TANAKA, M.; MITSURU, H.; YASUNOBU, K.T. y MORTENSON, L.E. 1978. The amino acid sequence of Clostridium pasteurianum iron protein, a component of nitrogenase. J. Biol Chem.; 252 , 7081 - 7093.
- TANNER, J.W. y ANDERSON, I.C. 1963. An external effect of inorganic nitrogen in roots nodulation. Nature ; 198 , 303 - 304 .
- THOMAS, R.J. y SCHRADER, L.E. 1981. Ureide metabolism in higher plant. Phytochemistry, 20, 361 - 371.
- THORNLEY, J.H.M. 1972. A balanced quantitative model for root: shoot ratios in vegetative plants. Ann. Bot., 36 , 431 - 441.
- THORNTON, H.G. 1936. Action of sodium nitrate on infection of lucerne root hairs by nodule bacteria. Proc. R. Soc. London Ser. 13. 119 , 47 - 92.
- TILL, A.R. 1978. Sulphur utilization in pastures. En : Plant Nutrition. Proc. of the 8th International Colloquium on Plant Analysis and Fertilizaer Problems. New Zealand.
- TINKER, P.B.H. 1979. Uptake and consumption of soil nitrogen in relation to agronomic practice. En : Nitrogen Assimilation of Plants. Proceedings of a symp. held at long Ashton Research Station. pp. 101 - 122.
- TJEPKEMA, J.D. y YOCUM, C.S. 1974. Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrode. Planta , 119, 351 - 360.

- TOPPAN, A.; ROBY, D. y ESQUERRE-TUGAYE, M.T. 1982. Cell surfaces in plant-microorganism interactions III. In vivo effect of ethylene on hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell wall of diseased plants. *Plant Physiol.*, 70, 82-86.
- TORREY, J.G. 1976. Root hormones and plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27, 435-459.
- TRANG, K.M. y GIDDENS. 1980. Shading and temperature as environmental factors affecting, growth, nodulation, and symbiotic N₂-fixation by soybeans. *Agron. J.*, 72, 305-308.
- TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. y KEY, J.L. 1970. Light-induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.*; 46, 800.
- TRAVIS, R.L. y KEY, J.L. 1971. Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in dark-grown corn seedlings. *Plant Physiol.*; 48, 617.
- TREVELIAN, W.E. y HARRISON, J.B. 1951. Studies on yeast metabolism. I. Fractionations and microdetermination of cell-carbohydrates. *Biochemical Journal*, 50, 298-317.
- TRIBOI-BLONDEL, A. M. 1979. Dynamique comparée de l'absorption des nitrates et de l'eau par les plantules du blé. *C.R. Acad. Sci.*, 283, 1545 - 1548.
- TRINCHANT, J.C. y RIGAUD, J. 1980. Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Arch. Microbiol.*, 124, 49-54.
- TRIPLETT, E.W.; BLEVINS, D.G. y RANDALL, D.D. 1980. Allantoinic acid synthesis in soybean root nodule cytosol via xanthine dehydrogenase. *Pl. Physiol.*; 65, 1203 - 1206.
- TSANG, M.L.S. y SCHIFF, J.A. 1976. Studies of sulfate utilization by algae. II Reactions of the adenosine 5'-phosphosulphate (APS) sulfotransferase from Chlorella and studies of model reactions which explain the diversity of side products with thiols. *Plant Cell. Physiol.*; 17, 1209 - 1220.
- TSIEN, H.C. y SCHMIDT, E.L. 1977. Polarity in the exponential phase Rhizobium japonicum cells. *Can. J. Microbiol.*, 23, 1274 - 84.
- TUBB, R.S. y POSTGATE, J.R. 1973. Control of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. *J. Gen. Microbiol.*, 79, 103 - 117.

- TYLER, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 1127 - 1162.
- ULRICH, A.; TABATABAI, M.A.; OHKI, K y JOHNSON, C.M. 1967. Sulfur content of alfalfa in relation to growth in filtered and unfiltered air. *Plant and Soil*, 26, 235-252.
- UPCHURCH, R.G. y ELKAN, G.H. 1978. Ammonia assimilation in Rhizobium japonicum I. Colonial deviations differing in nitrogen fixing efficiency. *J. Gen. Microbiol.*; 104, 219 - 225.
- VALERA, C.L. y ALEXANDER, M. 1965. Reversal of nitrate inhibition of nodulation by Indolyl-3- acetic acid. *Nature*, 206, 326.
- VALLE, B.L. y WACKER, W.E.C. 1976. En : CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology Proteins. G.D. Fasman, ed. 2, 276 - 292.
- VAN DER WERF, A.N. y YATES, M.G. 1978. Hydrogenase from nitrogen-fixing Azotobacter chroococcum. En : Hydrogenases, Their Catalytic Activity, Structure and Function, ed. H.G. Schlegel. K. Schneider, pp. 307-326. Göttingen Goltze, K.G. 453 pp.
- VAN KESSEL, C. y ROSCOSKI, J.P. 1981. Nodulation and N₂ fixation by Inga jinicuil, a woody legume in coffee plantations II. Effect of soil nutrients on nodulation and N₂ fixation. *Plant and Soil*, 59, 207 - 215.
- VASILAS, B.L.; EGG, J.O. y WOLF, D.C. 1980. Foliar fertilization of soybeans: Absorption and translocation of N¹⁵ labeled urea. *Agron. J.*, 72, 271-275.
- VEEGER, C.; LAANE, C.; HAAKER, H. y SCHERINGS, G. 1979. En: Proc. Steenbock kettering Int. Symp. Nitrogen Fixation (W.E. Newton, and W.H. Orme-Johnson, eds.) Vol 1, pp. 111-128. University Park Press, Baltimore.
- VEGA, J.M.; HERRERA, J.; APARICIO, P.J.; PANEQUE, A. y LOSA DA, M. 1971. Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. *Plant Physiol.*; 48, 294 - 299.
- VEGA, J.M. y KAMIN, H. 1977. Spinach nitrite reductase. *J. Biol. Chem.*, 252, 296 - 309.
- VERMA, D.P.S. y BAL, A.K. 1976. Intracellular site of synthesis and localization of leghaemoglobin in root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73, 3843 - 3847.
- VERMA, D.P.S.; ZOGBI, V. y BAL, A.K. 1978 a. A cooperative action of plant and Rhizobium to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Sci. Lett.*, 13, 127 - 42.

- VERMA, D.P.S.; KAZAZIAN, V.; ZOGBI, V. y BAL, A.K. 1978 b. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroid in soybean root nodules. *J. Cell Biol.*; 78, 919-936.
- VESK, M.; POSSINGHAM, J.V. y MERCER, F.V. 1966. The effect of mineral nutrient deficiencies on the structure of the leaf cells of tomato, spinach, and maize. *Austral. J. Bot.*, 14, 1 - 8.
- VIETS, F.G. Jr. y HAGEMAN, R.H. 1971. *Agr. Handbook No. 413* ARS, USDA, Washington, D.C.
- VIGUE, J.T.; HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. y PETERS, D.B. 1977. Nodulation of soybean grown by hydroponically on urea. *Corp. Sci.*; 71, 169-172.
- VILLAX, E.J. 1963. La culture des plantes fourragères dans la region mediterraneenne occidentale. *Les Cahiers de la Recherche Agronomique*, num. 17, I.N.R.A. Rabat, XI + 641.
- VINCENT, J.M. 1974. Root-nodule symbioses with Rhizobium. En: *The Biology of Nitrogen Fixation*. Ed. A. Quispel - North-Holland Publ., Amsterdam, 265 - 341.
- VINCENT, J.M. 1977. En: *A Treatise on Dinitrogen Fixation*. (R.W.F. Hardy and W.S. Silver, eds). Section III pp.277 366. Wiley. New York.
- VINCENT, J.M. 1979. Rhizobium general microbiology. En: *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* (A. Balows, H.G. Schlegel, M.P. Sarr, H. Stolp, and H.G. Trüpper, eds.) Springer-Verlag Berlin and New York.
- VIRTANEN, A.I. 1955. Biological nitrogen fixation. En: *Proc. 3rd Int. Congr. Biochem. (Brussels)* pp. 426 - 433. Academic Press. New York.
- VON PETER, A. 1980. Fertilizer requeriments in developing countries. *Proc. Fert. Soc.*; 188, 1 - 58.
- WAELE, M. de, 1970. *Rev. du G.A.M.S.* 3, 261. Citado en : Jaime Palacio, D. 1973. *Determinación analítica de nutrientes minerales en jugos vegetales*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- WAGNER, H. y MICHAEL, G. 1971. Effect of varied nitrogen supply on the synthesis of cytokinins in roots of sunflower. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)*; 162, 147-158.

- WALKER, N. 1978. On the diversity of nitrifiers in nature. En: Schlessinger, D. (Ed) Microbiology - 1978, pp.346-347. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- WALLACE, W. 1973. A nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root. Plant Physiol., 52, 197-201.
- WALLACE, W. y JOHNSON, C.B. 1978. Nitrate reductase and soluble cytochrome C reductase(s) in higher plants. Plant Physiol., 61, 748-752.
- WALLACE, W. y PATE, J.S. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to cocklebur (Xanthium pennsylvanicum Vallr.). Ann. of Bot. ; 31, 213-218.
- WARD, H.M. 1887. On the tubercular swellings on the roots of Vicia faba. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.; 178, 539-62.
- WEBB, J.R.; OHLROGGE, A.J. y BARBER, S.A. 1954. The effect of magnesium upon the growth and the phosphorus content of soybean plants. Proc. Soil Sci. Soc. Amer., 458-462.
- WEDDERBURN, M.E. 1983. The effect of source, concentration and time of application of nitrogen on the growth, nodulation and nitrogen fixation of Lotus pedunculatus and Trifolium repens. Plant and Soil, 4, 88-91.
- WERNER, D. y MÖRSCHER, E. 1978. Differentiation of nodules of Glycine max. Ultrastructural studies of plant cells and bacteroids. Planta ; 141 ; 169-177.
- WERNER, D. y STRIPF, R. 1978. Differentiation of Rhizobium japonicum. I. Enzymic comparison of nitrogenase repressed and derepressed free living cells and of bacteroids. Z. Naturforsch. Teil C, 33, 245-252.
- WEST, C.P.; MARTIN, N.P. y MARTEN, G.C. 1980. Nitrogen and Rhizobium effect on establishment of legumes via strip tillage. Agron. J., 72, 620 - 624.
- WILSON, LL.G.; REUVENY, Z. 1976. Sulphate reduction. En: Plant Biochemistry, 3^a ed. , J. Bonner y J.E. Varner - (eds.). Academic Press, New York, pp. 599-632.
- WILSON, P.W.; FRED, E.B. y SALMON, M.R. 1933. Relation between carbon dioxide and elemental nitrogen assimilation in leguminous plants. Soil Science, 35, 145-165.
- WONG, P.P. y EVANS, H.J. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybeans (Glycine max Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. Plant Physiol.; 47, 750 - 755.

- WONG, P.; EVANS, H.J.; KLUCAS, R. y RUSSELL, S. 1971.
En: Biological Nitrogen Fixation (T.A. Lie and E.G. Mulder, eds.) pp. 219 - 270. Academic Press. New York.
- WONG, P.P. 1980. Nitrate and carbohydrate effect on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) activity of lentils (Lens sculenta Moench). Plant Physiol., 66, 78-81.
- WOO, K.C.; ATKINS, C.A. y PATE, J.S. 1980. Biosynthesis of ureides from purines in a cell-free system from nodule extracts of cowpee (Vigna unguiculata, L Walp.). Plant Physiol., 66, 735-739.
- WOODING, F.J. 1970. Growth chamber and field experiments with plant nutrient sulphur. Agronomy, 31 (3), 1020-1021.
- WOODING, F.J.; PAULSEN, G.M. y MURPHY, L.S. 1971. Sulphur - composition of soybeans as affected by light and temperature. Soil Sci. and Plant Analysis, 2 (5), 353-362.
- WRIGHT, M.J. y DAVISON, K.L. 1964. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. Adv. Agron., 16, 197-247.
- YAO, P.Y. y VINCENT, J.M. 1969. Host specificity in root - hair "curling factor" of Rhizobium spp. Aust. J. Biol. Sci.; 22, 413-23.
- YAO, P.Y. y VINCENT, J.M. 1976. Factors responsible for the "curling" and branching of clover root hairs by Rhizobium Plant Soil ; 45, 1 - 16.
- YATES, M.G. 1972. Electron transport to nitrogenase in Azotobacter chroococcum. Purification and some properties of NADH dehydrogenase. FEBS Lett.; 27, 63 - 67.
- YATES, M.G. 1977. Physiological aspects of nitrogen fixation. En: Recent Development in Nitrogen Fixation. W. Newton, J.R. Postgate, C. Rodríguez-Barrueco (Eds.). Academic - Press, London.
- YATES, M.G. 1980. Biochemistry of nitrogen fixation. En: The Biochemistry of Plants. Academic Press, Inc. Vol. 5, pp.1
- YATES, M.G.; O'DONNELL, M.J.; LOWE, D.J. y BOTHE, H. 1978. Ferredoxins from nitrogen-fixing bacteria. Physical and chemical characterization of two ferredoxins from Mycobacterium flavum. 301. Eur. J. Biochem., 85, 291-299.
- YATES, M.G. y PLANQUE, K. 1975. Nitrogenase from Azotobacter chroococcum. Eur. J. Biochem.; 60, 467-476.

- YATES, M.G.; WALKER, C.C.; PARTRIDGE, C. D.P.; PEDROSA, F. O.; STEPHAN, M. y DOBEREINER, J. 1981. Hydrogen metabolism and nitrogenase activity in Azotobacter chroococcum and Azospirillum brasilense. En: Current Perspectives - in Nitrogen Fixation, ed. A. H. Gibson, W.E. Newton, pp. 56-66. New York: Elsevier. North Holland. 534 pp.
- ZAROUG, M.G. y MUNNS, D.N. 1979. Nodulation, nitrogen fixation, leaf area, and sugars content in Lablab purpureus as affected by sulfur nutrition. Plant and Soil, 53, 319-328.
- ZAROUG, M.G. y MUNNS, D.N. 1980. Effects of phosphorus and sulphur nutrition on soluble sugars and growth in Clitoria ternatea, L. Plant and Soil, 55, 243-250.
- ZIELKE, H.R. y FILNER, P. 1971. Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. J. Biol. Chem., 246, 1772 - 1779.
- ZORITA, E.; GUEDAS, J.R.; SUAREZ, A.; GUADA, J.A. 1972. Digestibilidad y valor nutritivo de las semillas de ocho leguminosas cultivadas para grano. An. Fac. Vet. Leon., XVIII, 552 - 559.
- ZSOLDOS, 1972. Citado por Mengel. K. y Kirkby, E.A. 1982. En: Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. Ed. Switzerland.

- HOEFT, R.G. y WALSH, L.M. 1975. Effect of carrier, rate and time of application on the yield, and S and N content of alfalfa. *Agronomy Journal*: 67, 427-430.
- JAGGI, R.C.; AULAKH, M.S. y DEV, G. 1977. Interaction effect of nitrogen and sulfur on growth and nutrient uptake by maize. *J. Nucl. Agric. Biol.* 6, 18-20.
- LEIDI, E.O. y GOMEZ, M. 1980. Estudio de la influencia de nitratos sobre el crecimiento y fijación de nitrógeno en plantas de judía (Phaseolus vulgaris, L.) *Ann. Edaf. y Agrobiol.* XXXIX. 2175-2197.
- LYND, J.Q.; McNEW, R.W. y ODELL, G.V. 1980. Defoliation effects on regrowth, nodulation and nitrogenase activity at anthesis with hairy vetch. *Agron. J.* 72, 991-994.
- SHEARD, R.W. 1980. Initial and residual utilization by alfalfa and bromegrass of sulphur from ³⁵S-labelled gypsum. *Commun. in Soil Science and Plant Analysis*, 11(6) 1, 605-619.
- REHM, G.W. y CALDWELL, A.C. 1970. Sulfur uptake by corn as influenced by ammonium and nitrate nitrogen. *Soil Sci. Amer. Proc.* Vol. 34. 41-48.
- RADET, E. (1966). Sulfur requirements of various crops". *Sulphur Inst.* 2, (1), 11-15.
- SORENSEN, R.C.; PENAS, E.J. y ALEXANDER, U.U. 1968. Sulfur content acid yield of alfalfa in relation to plant nitrogen and sulfur fertilization. *Agron. J.* 60, 20-24.
- RENDIG, V.V. y McCOMB, E.A. 1961. Effect of nutritional stress on plant composition. *Plant and Soil.* 14, 176-186.
- PASRICHA, N.S. y RANDHAWA, N.S. 1975. Effect of sulfur fertilization on the nitrogen metabolism in Berseem. *Indian J. Agric. Sci.* 45, 213-218.
- METSON, A.J. 1973. Sulphur in forage crops. *Tech. Bull. Sulphur Inst.* N^o 20. (Washington, D.C.).
- RADFORD, R.L.; CHAVENGSAKSONGKRAM, Jr. G. y HYMOWITZ, T. 1977. Utilization of nitrogen to sulphur ratio for evaluating sulfur-containing amino acid concentrations in seed of Glycine max and G. soja. *Crop Science*, 17, 273-277.
- SINGH, B.K. y MODGAL, S.C. 1978. Dry matter production, phosphorus and potassium uptake as influenced by levels and methods of nitrogen application in rainfed upland rice. *Plant and Soil* 50, 691-701.

- SACCHIDANAND, N.J.; SAWARKAR, N.J.; GHURAYYA, R.S.; SHINDE, D. A. y SINHA, S.B. 1980. Response of soybean (Glycine max) to sulphur and phosphorus. J. Indian Soc. Soil Sci. 28 (2), 189-192.
- MARTEL, Y.A. y ZIZKA, J. 1977. Yield and quality of alfalfa as influenced by additions of S to P and K fertilizations under greenhouse conditions. Agronomy, J. 69, 531-35.
- SKROLETA, V.; GAUDINOVA, A.; NEMCOVA, M. y HYNDRAKOVA, A. 1980. Symbiotic dinitrogen fixation as affected by shortterm application of nitrate to nodulated Pisum sativum, L. Folia Microbiol. 25, 155-161.
- REED, A.J. y HAGEMAN, R.H. 1980. Relationship between nitrate uptake, flux, and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (Zea mays L.). Plant Physiol. 66, 1184-1189.
- VANCE, P.C. y HEICHEL, G.H. 1981. Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. Plant Physiol.: 68, 1052-1056.
- PANKHURST, C.E. y JONES, W.T. 1979. Effectiveness of lotus - root nodules. III. Effect of combined nitrogen on nodule effectiveness and flavolan synthesis in roots. J. Exp. Bot. 30, 1109 -1118.
- TIMPO, E.E. y NEYRA, C.A. (1983). Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in Phaseolus vulgaris, L. Plant Physiol. 72, 71-75.
- VANCE, C.P.; HEICHEL, G.H.; BARNES, D.K.; BRYAN, J.W. y JOHNSON, L.E. 1979. Nitrogen fixation nodule development and vegetative regrowth of alfalfa following harvest. Plant Physiol. 64, 1-8.
- OLIVARES, J. MARTIN, E. y RECALDE, L. 1982. Effect of nitrogen and sulphur application and seed inoculation with Rhizobium leguminosarum on the yield of beans (Vicia faba) in field trials.
- SHEARD, R.W.; JACKMAN, R.H. y BUTLER, G.W. 1978. Utilization by white clover and ryegrass of sulphur from 35S-labelled gypsum. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 9: 935-954.