

T  
15  
146

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL  
CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS  
DE Vicia faba: EFECTO DEL ESTRÉS SALINO**

**María del Pilar Cordovilla Palomares**

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	619685415
Nº Copia	21236318

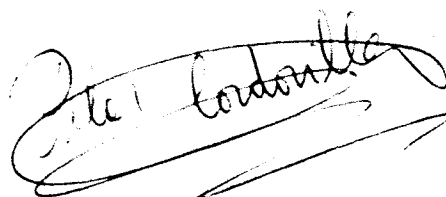
**TESIS DOCTORAL**

**1992**

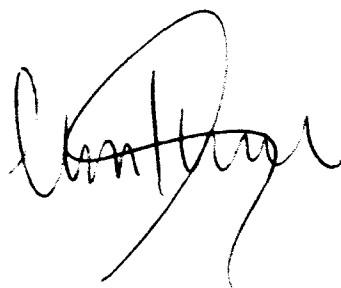
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Estudios fisiológicos y bioquímicos del ciclo  
de la glutamato sintasa en nódulos de Vicia faba:  
efecto del estrés salino

Memoria para aspirar al Grado de  
Doctor por la Licenciada en Ciencias  
María del Pilar Cordovilla Palomares



Directores:



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



Fdo: Francisco Liger Liger  
Profesor Titular de Fisiología Vegetal  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

# Indice

	Pág.
I. INTRODUCCION .....	1
1. El nitrógeno en la biosfera .....	2
2. Fijación biológica de nitrógeno .....	2
3. Fijación simbiótica de nitrógeno: simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa .....	3
3.1. Familia <i>Leguminosaceae</i> .....	3
3.1.1. <i>Vicia faba</i> .....	4
3.2. Familia <i>Rhizobiaceae</i> .....	5
3.3. Establecimiento de simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa .....	6
3.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno: Nitrogenasa e Hidrogenasa .....	8
3.5. Nodulinas .....	.01
4. Metabolismo del nitrógeno en plantas .....	.31
4.1. Asimilación de nitrato .....	.31
4.2. Asimilación de amonio .....	.51
4.2.1. Ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa .....	.51
4.2.2. Glutamato deshidrogenasa .....	.32
5. Limitaciones del uso de las leguminosas: salinidad .....	.42
5.1. Efecto de la salinidad en la planta .....	.52
5.2. Efectos producidos en los nódulos por la salinidad .....	.72
5.3. Metabolismo nitrogenado bajo condiciones de estrés salino .....	.92
5.4. Respuesta fisiológica ante el estrés salino .....	.13
6. Perspectivas .....	.43
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	.53
1. Material biológico .....	.63
1.1. Material vegetal .....	.63
1.2. Microorganismos .....	.63
1.3. Material animal .....	.73
2. Medios de cultivo .....	.73
2.1. Solución nutritiva para plantas .....	.73

2.2. Medios de cultivo utilizados para la conservación bacteriana y para la preparación de inóculos . . . . .	.83
2.2.1. Medio 79 de Allen . . . . .	.83
2.2.2. Medio YEM . . . . .	.83
2.2.3. Medio bacteriano para curvas de crecimiento . . . . .	.93
3. Crecimiento bacteriano . . . . .	.93
3.1. Crecimiento de inóculos . . . . .	.93
3.2. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de <i>R. leguminosarum</i> . . . . .	.93
3.2.1. Crecimiento de <i>R. leguminosarum</i> GRA19 con diferentes concentraciones de NaCl en el medio . . . . .	.04
3.2.2. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de <i>R. leguminosarum</i> . . . . .	.04
4. Cultivo de plantas . . . . .	.14
4.1. Cultivo hidropónico . . . . .	.14
4.2. Esterilización y germinación de las semillas . . . . .	.14
4.3. Preparación del inóculo . . . . .	.14
4.4. Siembra e inoculación . . . . .	.14
4.5. Condiciones de la cámara de cultivo . . . . .	.24
5. Experimentos realizados en plantas . . . . .	.24
5.1. Desarrollo ontogénico de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de <i>V. faba</i> . . . . .	.34
5.2. Evolución en el fotoperiodo del ciclo de la glutamato sintasa nódulos fijadores de dinitrógeno de <i>V. faba</i> . . . . .	.34
5.3. Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación . . . . .	.44
5.4. Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijando nitrógeno . . . . .	.44
5.5. Tolerancia al estrés salino en <i>V. faba</i> : utilización de líneas puras . . . . .	.54
5.6. Interacción de la fertilización nitrogenada y la sal en la simbiosis <i>Rhizobium leguminosarum-V. faba</i> . . . . .	.64
6. Metodología empleada . . . . .	.64

6.1. Análisis del crecimiento .....	64
6.2. Actividades de la nitrogenasa .....	74
6.2.1. Producción de hidrógeno .....	84
6.2.2. Actividad reductora de acetileno .....	84
6.2.3. Cálculo de la eficiencia relativa .....	84
6.3. Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos .....	84
6.3.1. Preparación de extractos libres de células .....	84
6.3.2. Valoración de la actividad glutamina sintetasa .....	94
6.3.3. Valoración de la actividad NADH-glutamato sintasa ..	94
6.3.4. Valoración de la actividad NADH-glutamato deshidrogenasa .....	05
6.3.5. Cálculo de las actividades NADH-GOGAT y NADH-GDH .....	05
6.3. Determinaciones analíticas .....	15
6.3.1. Determinaciones realizadas en nódulos .....	15
6.3.1.1. Determinación de proteínas .....	15
6.3.1.2. Determinación de prolina .....	15
6.3.2. Determinaciones realizadas en parte aérea y raíz .....	15
6.3.2.1. Determinación de nitrógeno .....	25
6.3.2.2. Determinación de potasio y sodio .....	25
6.3.2.3. Determinación de calcio y magnesio .....	25
6.4. Presentación y estudio estadístico de los resultados .....	35
7. Caracterización de la NADH-glutamato sintasa de nódulos de <i>V. faba</i> ..	35
7.1. Purificación de la enzima .....	35
7.1.1. Preparación del extracto crudo .....	35
7.1.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico .....	45
7.1.3. Diálisis .....	45
7.1.4. Cromatografía de intercambio iónico .....	45
7.1.5. Cromatografía de exclusión molecular .....	45
7.1.6. Criterio de pureza .....	55
7.2. Separación de posibles isoenzimas de la NADH-GOGAT .....	55

7.2.1. Preparación de extractos crudos	.55
7.2.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico	.55
7.2.3. Diálisis	.55
7.2.4. Cromatografía en DEAE-sepharosa	.55
7.2.5. Diálisi	.65
7.2.6. Cromatografía en Q-sepharosa	.65
7.3. Técnicas electroforéticas	.65
7.3.1. Electroforesis desnaturalizante	.65
7.3.2. Electroforesis en gradiente de acrilamida	57
7.3.3. Tinción de proteínas en geles	.75
7.3.3.1. Tinción con azul Coomassie	.75
7.3.3.2. Tinción por actividad	.85
7.3.3.2.1. Tinción positiva	.85
7.3.3.2.2. Tinción negativa	.85
7.4. Determinación del peso molecular por filtración en gel	.85
7.5. Técnicas inmunológicas	.95
7.5.1. Obtención de anticuerpos	.95
7.5.1.1. Inmunización del conejo	.95
7.5.1.2. Obtención de suero	.06
7.5.2. Métodos inmunológicos	.06
7.5.2.1. Titulación de los anticuerpos	.06
7.5.2.2. Liberación de los complejos antígeno- anticuerpo de la proteína A-sepharosa para usarlos en electroforesis	.06
7.5.2.3. Ensayo de la especificidad de los anticuerpos. "Western blot"	.16
III. RESULTADOS Y DISCUSION	.46
1. Curvas de crecimiento y de resistencia al NaCl de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	64
1.1. Influencia de distintos niveles de NaCl en el crecimiento de la cepa GRA19 de <i>R. leguminosarum</i>	.46

1.2. Crecimiento de distintas cepas de <i>R. leguminosarum</i> .....	76
2. Desarrollo ontogénico de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de <i>V. faba</i> .....	07
2.1. Crecimiento, nodulación y acumulación de nitrógeno en planta	07
2.2. Actividades de la nitrogenasa: eficiencia relativa .....	47
2.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos ..	57
3. Parcial purificación y caracterización del ciclo glutamato sintasa en la fracción vegetal de nódulos de <i>V. faba</i> .....	97
3.1. Determinación de posibles isoformas de la NADH-GOGAT ..	18
3.2. Determinación del peso molecular de la subunidad de la NADH-GOGAT .....	38
3.3. Determinación del peso molecular nativo de la NADH-GOGAT	38
3.4. Estudio de la especificidad de los anticuerpos frente a la NADH-GOGAT .....	58
4. Evolución en el fotoperíodo del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos fijadores de dinitrógeno de <i>V. faba</i> .....	68
4.1. Actividad nitrogenasa .....	78
4.2. Actividades de la fracción vegetal de los nódulos .....	78
5. Efecto del cloruro de sodio en la simbiosis de <i>V. faba</i> : Aplicación en el momento de la inoculación .....	09
5.1. Crecimiento y nodulación .....	09
5.2. Actividad nitrogenasa .....	49
5.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos ..	69
6. Efecto del cloruro de sodio aplicado a simbiosis ya establecidas y fijadoras de nitrógeno .....	79
6.1. Crecimiento y nodulación .....	79
6.2. Actividad nitrogenasa .....	81
6.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos ..	81
7. Tolerancia al estrés salino en <i>V. faba</i> : Utilización de líneas puras .....	81
7.1. Crecimiento y nodulación .....	81



7.2. Actividad nitrogenasa ..... 31

7.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos . 31

IV. CONCLUSIONES ..... 21

V. BIBLIOGRAFIA ..... 41

## **Introducción**

## 1. EL NITRÓGENO EN LA BIOSFERA

El nitrógeno constituye el 78% de la atmósfera, donde se encuentra en forma de gas químicamente inerte, por tanto no aprovechable para los seres vivos. No obstante, la litosfera es el mayor reservorio de nitrógeno y la cantidad de este elemento existente en ella es más de cincuenta veces la de la atmósfera. Sin embargo, debido a que se encuentra en forma muy estable en rocas primarias y sedimentarias, tiene una baja participación en el ciclo del nitrógeno de la biosfera (Subba Rao, 1977). De ahí la importancia que adquieren los mecanismos de fijación de nitrógeno y la transformación cíclica de los compuestos nitrogenados para proveer las formas requeridas de nitrógeno a los distintos organismos vivos de la biosfera.

Este elemento está considerado como esencial para todos los organismos vivos. Forma parte de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos y de compuestos cuantitativamente menos significativos como coenzimas, vitaminas y pigmentos. Es evidente, por tanto, que para crecer, multiplicarse y sobrevivir las plantas necesitan una fuente de nitrógeno.

A pesar de que el nitrógeno es un elemento abundante en la naturaleza, también es el nutriente limitante más frecuente en la productividad vegetal. Esto es debido a que la mayoría de las plantas absorben el nitrógeno combinado del suelo, donde se encuentra como nitrógeno orgánico o inorgánico en forma de nitratos o amonio. El nitrógeno atmosférico no es directamente aprovechable por las plantas y solo puede ser fijado por algunas bacterias del suelo, por cianocifeas y por bacterias que viven en simbiosis con leguminosas y otras especies de plantas.

## 2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN VIDA LIBRE

La fijación biológica de nitrógeno se ha encontrado en eucariotas aunque también está ampliamente distribuida entre eubacterias y arqueobacterias. Recientemente Young (1992) ha elaborado un catálogo de fijadores de nitrógeno en el que se engloban cerca de un centenar de géneros en ocho categorías distribuidas entre la mayoría de las divisiones filogenéticas. Esta recopilación es consecuencia del estudio de la evolución a nivel molecular, por hibridación, catalogación y secuenciación, siendo la clave del proceso la biomolécula 16S del ARN ribosómico que es universal y conserva su función (Wose, 1987).

La aportación de amonio al suelo por fijación en vida libre es 1000 veces menos efectiva que la de una asociación simbiótica, puesto que casi todo el amonio que producen es autoasimilado rápidamente. Los principales fijadores en vida libre son las cianobacterias

formadoras de heterocistos, *Anabaena* y *Nostoc* y entre las bacterias destacan, las bacteria anaerobias como, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Bacillus polymyxa*, las bacterias anaeróbicas (bacterias fotosintéticas) como, *Clostridium* spp, *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. La contribución de estos grupos a la fijación biológica de nitrógeno es escasa (Stewart, 1982).

Aunque se puede mencionar determinadas excepciones:

- *Clostridium* en zonas pantanosas y cultivos de arroz puede contribuir por encima de 33 Kg/Ha/año al nitrógeno fijado del suelo (Mishustin y Yemstev, 1975).

- *Azospirillum* spp, cuando se asocia con las raíces de algunas plantas herbáceas y cereales (Boddey y Döbereiner, 1984; Okon, 1984), se producen beneficios en uno o ambos sentidos pero sin que se produzca ningún cambio anatómico ni fisiológico importante. Del nitrógeno fijado por *Azospirillum* la planta utiliza el 5% y no de forma directa (Okon *et al.*, 1983), ya que la planta dispone de él según mueren las bacterias, lo que supone una previa mineralización antes de ser absorbido.

- *Azotobacter*, también es capaz de formar asociaciones no simbióticas con las raíces de plantas, llegando incluso a darse casos de especificidad entre ambas asociaciones (Döbereiner *et al.*, 1972).

### 3. FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO: SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

La asociación formada entre las leguminosas y las bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que colonizan sus raíces formando nódulos, presenta dos características claves, por una parte es el sistema que contribuye de forma mayoritaria al ciclo del nitrógeno y por otra parte es ampliamente reconocido el interés agrícola y ecológico de estos cultivos. En consecuencia, los estudios para conocer y potenciar esta simbiosis están justificados.

#### 3.1. Familia *Leguminosaceae*

Esta numerosa familia botánica está ampliamente distribuída, estimándose entre 16000 y 20000 especies incluídas en 750 géneros (Polhill y Raven, 1981). Taubert (1984), basándose en las diferencias florales, divide esta familia en 3 subfamilias, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Sin embargo, hay alguna reestructuración taxonómica que le adjudica rango de familia a cada una de las 3 subdivisiones, quedando incluídas como familias *Mimosaceae*, *Caesalpinioideae* y *Fabaceae* o *Leguminosaceae* dentro del orden *Leguminales* (Hutchinson, 1964).

A la *Caesalpinioideae* la evolución la señala como la más antigua de las tres familias (Watson, 1981), está formada por árboles y arbustos que se utilizan en la industria maderera y como plantas ornamentales. Algunas especies producen taninos, tintes, materias primas de interés farmacéutico, gomas y mucílagos, entre otros productos de interés industrial. Los datos bibliográficos señalan que solo un 3-5% de las especies nodulan.

La familia *Mimosaceae* incluye árboles, plantas leñosas tropicales y subtropicales y algunas plantas herbáceas perennes. Hay numerosas especies ornamentales de utilidad en floricultura y horticultura. Son también fuentes de taninos, goma arábiga, mucílagos, perfumes y colorantes. Se consideran plantas que aportan una fuente de nitrógeno en ecosistemas extremos, como regiones árticas o bosques australianos. El 30% de los géneros estudiados presentan nódulos (Allen y Allen, 1981) radicales, excepto en *Neptunia* que forma nódulos en tallos. Al estudiar la estructura del nódulo se evidencian aspectos morfológicos característicos como la ausencia del cordón de infección, también que los nódulos se encuentran en plantas con raíces carentes de pelos radicales y no asociados a raíces laterales, por lo que en estas plantas, la infección tiene lugar bien entre células epidérmicas de la raíz o bien a través de heridas (Sprent *et al.*, 1987).

La familia *Papilionaceae* incluye todos los cultivos de legumbres con frutos y semillas ricas en lípidos así como la mayor parte de especies forrajeras de importancia agrícola. También se encuentran familia arbustos y árboles utilizados en horticultura ornamental, en plantaciones que previenen la erosión del suelo y aumentan el contenido en nitrógeno del mismo. Las leguminosas-grano directamente explotadas por el hombre pertenecen en su mayoría a las tribus *Phaseoleae*, *Vicieae* y *Cicereae*. Las leguminosas de interés en pastos y forrajes se agrupan entorno a las tribus *Trifoliae* y *Loteae*. Además, también se encuentran en esta familia, la tribu *Aeschynomeneae* que contiene una importante leguminosa-grano, el cacahuate y la tribu *Genisteae* que aporta sólo un género, *Lupinus*, al catálogo de leguminosas grano. La nodulación entre miembros de esta familia se sitúa entorno al 97%.

### 3.1.1. *Vicia faba*

Es una leguminosa anual de tallo único, erecto, duro, hueco y frondoso; su altura va de 60 a 180 cm. No tiene zarcillos, presenta una raíz bien desarrollada y muchas raíces laterales que sostienen racimos de nódulos pequeños y lobulados que crecen horizontalmente. Las hojas son alternas, pinnadas, enteras, ovaladas y con una longitud entre 5 y 7.5 cm. El peciolo es acanalado, con pequeños pulvínulos. Las flores nacen en la axila de la hoja y son de color variable.

La sistemática de las especies de haba es muy confusa. Así, clásicamente se han

reconocido dos variedades distintas: *hortensis* o haba de jardín o culinaria y *equina* o haba de campo. Murotava (1931) subdivide a *Vicia faba* en dos especies, *pancijuga* y *faba*, según el número de foliolos por hoja, y esta última en tres variedades, *major*, *equina* y *minor*, según la relación grosor/longitud. Cubero y Suso (1981) encuentran que la principal característica que discrimina a estos grupos de cultivares es el tamaño de la semilla. Cubero (1984) sugiere que existen cuatro subespecies: *minor* (semillas pequeñas, redondeadas, tipificada como el haba común), *equina* (tamaño medio, tipificada como el haba de burro), *faba* (variedad mayor, haba culinaria o de horticultura con semilla ancha y grande) y *pancijuga*, que ya había reconocido Hanelt (1972) como una raza geográfica de la subespecie *minor*.

Las semillas muestran una gran variación, algunas son angulosas y están fuertemente comprimidas y otras son casi globosas. Su coloración externa puede ser blanca, amarilla, marrón, verde, púrpura o negra; todas poseen hilo prominente, que puede ser blanco, amarillo o negro (Kay, 1979). La composición aproximada es de 11% de humedad, 30% de proteínas, 45% de carbohidratos, 2% de grasa, 8% de fibra y 4% de cenizas (Clausen y Hansen, 1968). Se han identificado como proteínas mayoritarias las globulinas de 7S y 11-13S, correspondientes a vicilina y legumina y las albúminas (Millerd 1975). La relación entre las distintas proteínas varía con la variedad y el genotipo (Pasqualini *et al.*, 1991). La composición de aminoácidos demuestra que son más ricas en lisina que los cereales (Hagberg y Sjödin, 1975) y más pobres en aminoácidos azufrados.

### 3.2. Familia *Rhizobiaceae*

Las bacterias que forman simbiosis fijadoras de nitrógeno con las plantas leguminosas pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Clásicamente se han clasificado en dos géneros: *Rhizobium* (rápido crecimiento) y *Bradyrhizobium* (lento crecimiento), basándose en la velocidad de crecimiento (tiempo de generación) en un medio manitol-extracto de levadura. Estos dos grupos difieren además en la utilización de varios compuestos carbonados (Graham, 1964). El manual Bergey's de bacteriología sistemática también incluye en esta familia un tercer género, *Agrobacterium*, que forma asociaciones no mutualistas con plantas dicotiledóneas; especies como *A. tumefaciens* y *A. rubi* forman tumores en las raíces y *A. rhizogenes* estimula la formación de hipertrofias corticales y la proliferación de raíces adventicias (Sneath, 1986; Slaley, 1989; Willians, 1989).

Los estudios de homología del ADN y análisis del ARN ribosomal demuestran que *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* no están relacionados entre sí; en cambio, entre *Rhizobium* y

*Agrobacterium* se presenta una estrecha correlación. La principal característica que une *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es su capacidad de formar nódulos con las leguminosas, por lo que es de interés determinar las semejanzas entre sus genes simbióticos.

La clasificación actual, basada además del hospedador en otras características, tales como homología del ADN (Jarvis *et al.*, 1980), relaciones serológicas (Vincent, 1977), perfil de proteínas solubles por electroforesis (Roberts *et al.*, 1980), presencia de polisacáridos, fagotipos, serotipos y utilización de azúcares y aminoácidos (Jordan 1984; Scholl y Elkan, 1984, Dreyfus *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1988), establece cuatro géneros:

- Género *Rhizobium*: Se incluyen tres especies de rápido crecimiento.
  - a) *Rhizobium leguminosarum* que agrupa tres biovariedades: biovar. *viciae*, que infecta a las leguminosas de los géneros *Pisum*, *Vicia* y *Lens*; biovar. *phaseoli* que infecta a *Phaseolus* y biovar. *trifolii* que infecta a especies de *Trifolium*.
  - b) *Rhizobium meliloti* permanece como especie independiente y nodula a las especies de los géneros *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella* entre otras.
  - c) *Rhizobium loti*, que agrupa a microorganismos capaces de nodular un amplio rango de hospedadores entre las que se encuentra *Lotus*, *Cicer*, *Robinia pseudoacacia*, *Onobrychis*, y *Leucaena*.
- Género *Bradyrhizobium*: Las especies de lento crecimiento quedan agrupadas en la especie *B. japonicum*, que nodula a *Glycine* y *Lupinus*.
- Género *Sinorhizobium*: Género propuesto para la antigua especie de *R. fredii* que agrupa bacterias de rápido crecimiento capaces de nodular *Glycine*. Este nuevo género incluye dos especies, *S. fredii* y *S. xinjiangensis*.
- Género *Azorhizobium*: Incluye la especie *A. caulinodans*, que forma nódulos fijadores en raíz y tallo de *Sesbania rostrata*.
- Recientemente Sprent (1990) ha incluido un quinto género, el género *Photorhizobium*.

### 3.3. Establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Las bacterias del género *Rhizobium* infectan las células corticales de las raíces de leguminosas y dan lugar a la formación de nódulos. El proceso de nodulación ha sido ampliamente estudiado (Groves *et al.*, 1985; De Lajudie y Huguet, 1988) y se puede resumir en 3 etapas: a) especificidad o estado de preinfección, b) infección y formación del nódulo, en la que se incluyen, la unión de *Rhizobium* al pelo radical, la deformación de éste, la

iniciación y la elongación del cordón de infección y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del cortex radical, c) efectividad o funcionamiento del nódulo.

El desarrollo de los nódulos ha sido caracterizado por Vincent (1980) en una serie de etapas secuenciadas e independientes. Se le han asignado códigos fenotípicos, que pueden estar influenciados por uno o más genes (Appelbaum, 1990) y han sido revisadas recientemente por Sprent (1989). Este proceso involucra además del estadio de preinfección, otros dos eventos independientes: la infección (invasión) y el desarrollo del nódulo en el que se incluye la división celular, la diferenciación y la funcionalidad.

La infección de las leguminosas por *Rhizobium* ocurre a través de tres vías alternativas, a través del pelo radical, la más usual, a través de las heridas (Pueppke, 1986) y por las células epidérmicas descrito por Faria *et al.* (1988). La naturaleza química y física de la pared celular del pelo radical es probablemente un factor crítico para determinar la infección (Sequeira, 1986). Además, en la infección hay que considerar dos aspectos claves de *Rhizobium*: los polisacáridos que segregan, de los que al menos existen cuatro tipos (Carlson, 1982; Reuber *et al.*, 1991) que son degradados por enzimas celulolíticos y pectolíticos (Martínez-Molina y Olivares, 1982) y los genes *nod*, que controlan la infección e iniciación del nódulo inducidos por exudados radicales (Zaat *et al.*, 1989b).

El proceso de infección incluye: la unión al pelo radical (Roa), la deformación de éstos (Hac), la iniciación y la elongación del cordón de infección (Inf) y la liberación de bacterias en el interior de las células vegetales del cortex radical (Bar).

En consecuencia de la liberación de quimioattractantes por la plantas, las señales inducidas por los genes *nod* y las señales específicas producidas por *Rhizobium* se induce el crecimiento y el metabolismo de las células nodulares en la raíz. Una o más de estas señales moleculares es un mitógeno específico que probablemente actúe influenciando el balance endógeno hormonal (Ligero *et al.*, 1991; Zaat *et al.*, 1989a; Van Brussell, 1990).

Paralelamente al proceso de infección, algunas células del cortex radical se diferencian para dar lugar a la iniciación del nódulo (Noi). Esto implica el inicio de la mitosis cortical, formación del meristemo nodular y desarrollo de la estructura del nódulo. Ambos procesos, tanto la infección como el desarrollo del nódulo se inician a las pocas horas de haberse puesto en contacto la bacteria con la raíz. Ciertos mutantes de *R. meliloti*, *R. phaseoli* y *Agrobacterium* conteniendo genes de *R. meliloti* pueden inducir nódulos que experimentan desarrollo sin evidencia de infección (Truchet *et al.*, 1985; Finan *et al.*, 1985). Por el contrario, se puede desarrollar el cordón de infección en ausencia del desarrollo nodular (Djordjevic *et al.*, 1985).

Los últimos estadios de la simbiosis incluyen la diferenciación de la bacteria en bacteroide (Bad), quedando confinado en vesículas rodeadas por la membrana



peribacteriodes, la síntesis de nitrogenasa (Nif) y otros metabolitos codificados por genes requeridos para la fijación (Cop) y la persistencia del nódulo (Nop).

Se han descrito dos tipos de nódulos en las leguminosas, nódulos determinados y nódulos indeterminados, que difieren en su morfología, en su funcionamiento y en la presencia o no de meristemo apical (Dart, 1977; Newcomb, 1981). Las leguminosas de zonas templadas como *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium* y *Medicago* desarrollan nódulos indeterminados, mientras que las leguminosas de zonas tropicales, *Glycine*, *Phaseolus*, etc, presentan nódulos determinados.

### 3.3. Bioquímica de la fijación de nitrógeno: Nitrogenasa e Hidrogenasa

La capacidad de fijar nitrógeno se debe al complejo enzimático nitrogenasa, purificado y aislado por primera vez por Carnaham *et al.* (1960) en *Clostridium pasteurianum*.

El complejo enzimático consta de dos componentes: el componente I, una molibdoferroproteína o nitrogenasa y el componente II, que es una ferroproteína denominada nitrogenasa reductasa. El centro activo del enzima es un cofactor con hierro y molibdeno denominado FeMoco (Imperial *et al.*, 1989). La actividad viene determinada por la existencia de los dos componentes, ATP-Mg<sup>2+</sup>, donadores de electrones y un sistema de protección frente al oxígeno (Postgate, 1989). Normalmente como donador de electrones para el enzima *in vivo* actúa la ferredoxina y flavodoxina (Gallon y Chaplin, 1987), que proporcionan los equivalentes de reducción necesarios para reducir al nitrógeno. El mecanismo de transferencia de electrones ha sido recientemente descrito por Thorneley (1990) mediante un proceso endergónico que requiere un mínimo de energía de 960 KJ por unidad de nitrógeno fijado. De ahí, que se requieran 16 moléculas de ATP hidrolizadas por los 8 electrones transportados a través del complejo nitrogenasa (Pate y Layzell, 1990).

Se ha descrito la existencia de una nitrogenasa independiente del molibdeno y dependiente del vanadio (Bishop *et al.*, 1980; Robson *et al.*, 1986) denominada nitrogenasa-2, cuyo centro activo es el FeVaco. Asimismo, se ha encontrado una nitrogenasa-3, dependiente del hierro como único metal en el centro activo del enzima, FeFeco (Bishop *et al.*, 1988; Bishop, 1990).

La nitrogenasa de todos los diazotrofos en los que se ha estudiado reduce protones a hidrógeno, concomitantemente con la reducción de nitrógeno a amonio. Bulen y Le Compte (1966) describieron este hecho por primera vez en extractos de *Azotobacter* y demostraron que el proceso es dependiente del ATP. El mecanismo más aceptado para explicar esta producción de hidrógeno fue propuesto inicialmente por Chatt (1980) y

revisado posteriormente por Lowe *et al.* (1985) y Torneley y Lowe (1985). El modelo predice una estequiometría de 1 mol de hidrógeno producido por mol de nitrógeno fijado, lo que implica que el 25% de los electrones que pasan a través de la nitrogenasa se desvían y en consecuencia es una fuente de ineficiencia de esta actividad (Schubert y Evans, 1976; Dixon *et al.*, 1981).

La presencia de un sistema con capacidad de oxidar el hidrógeno independiente de la nitrogenasa (sistema Hup), se ha demostrado en algunas cepas de *Bradyrhizobium* sp (vigna y cowpea), *B. japonicum*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum* biovar. *viciae* (Evans *et al.*, 1981; Brewin, 1984; Evans *et al.*, 1985; 1987) y en *Azorhizobium caulinodans*, bacteria que nodula en tallos (Stam *et al.*, 1984). Puesto que ambas enzimas, nitrogenasa e hidrogenasa, están involucrados en el metabolismo del hidrógeno en los nódulos radicales, el nivel de esta molécula en el nódulo es difícil de evaluar cuantitativamente. Esto indujo a Schubert y Evans (1976) a definir el término de eficiencia relativa, que relaciona el desprendimiento de H<sub>2</sub> con el flujo de electrones a través de la nitrogenasa.

El valor de eficiencia relativa indica la eficiencia del sistema fijador de nitrógeno. El máximo valor es 1 e indica que no hay liberación de hidrógeno. Para un sistema que carece de hidrogenasa su máximo valor teórico es 0.75, por tanto valores entre 0.75 y 1 indican que alguna hidrogenasa está presente aunque no lo suficientemente eficiente para consumir todo el hidrógeno (Evans *et al.*, 1981; Simpson *et al.*, 1984).

A esta actividad se le atribuyen diversas funciones, todas ellas beneficiosas para la fijación de nitrógeno (Dixon, 1972). Por una parte se elimina hidrógeno, que puede inactivar a la nitrogenasa, aún cuando se cuestionan dos hechos, que la concentración de hidrógeno alcanzada fuera y la presencia de barreras en el medio que impidan su difusión. Sin embargo, los datos de K<sub>i</sub> encontrados para el hidrógeno para inhibir la reducción de nitrógeno (Rasche y Arp, 1989), así como las concentraciones de ambos gases en el interior del nódulo (Hunt *et al.*, 1988), postulan este efecto como correcto. Por otra parte el potencial redox de la oxidación de hidrógeno es lo suficientemente bajo, - 420 mV, como para que se pueda utilizar como fuente adicional de poder reductor y energía para el sistema fijador de nitrógeno. La oxidación del hidrógeno acoplada a la formación de ATP ha sido descrita por Dixon (1957), Ruiz-Argüeso *et al.* (1979) y Nelson y Salminen (1984), entre otros. Por último, la eliminación de hidrógeno está acoplada a la eliminación de oxígeno, con lo que se protege a la nitrogenasa de este último. De esta manera, se favorece el mecanismo de "protección respiratoria", presente en bacterias fijadoras de nitrógeno en aerobiosis. Esta protección respiratoria no ha sido demostrada en nódulos intactos (Devon *et al.*, 1989; Garrido, 1992).

La hidrogenasa ha sido aislada de numerosos microorganismos (O'Bran y Maier,

1988) y purificada a homogeneidad de bacteroides (Arp, 1985) y de células quimioautotróficas (Harker *et al.*, 1984). El enzima es una proteína de localización citoplasmática unida a membranas,  $\alpha\beta$ -dimérica, con un peso molecular nativo de 100 kDa, con dos subunidades de 65 y 35 kDa. Contiene Ni y Fe en una relación 1/10. Posee dos centros 4Fe-4S, un centro 3Fe-4S y un centro con Ni (Fangue *et al.*, 1988). El aceptor de electrones endógeno es desconocido, pudiendo actuar el azul de metileno y el bencil viológeno como donadores exógenos. Los inhibidores del enzima son el CO (Arp y Burris, 1981), el acetileno (Hyman y Arp, 1987) y el oxígeno (Seefeldt y Arp, 1989a). Como moderador actúa el oxígeno y la cianida (Seefeldt y Arp, 1989b).

Respecto al funcionamiento fisiológico y genético de la hidrogenasa, se puede indicar que este enzima, por sí mismo, no es capaz de transferir los electrones del hidrógeno al oxígeno directamente. Esbrenner y Evans (1983) proponen la cadena transportadora de electrones en esta transferencia. Profundizando en esta posibilidad se han realizado diversos estudios por Emmerich *et al.* (1979) y O'Brian y Maier (1985). Los genes de la oxidación de la hidrogenasa se han designado como *hup* y el fenotipo como HUP. En *Bradyrhizobium japonicum* los genes *hup* no parecen estar asociados a un plásmido (Cantrell *et al.*, 1982), mientras que en *R. leguminosarum* están localizados en el plásmido *sym* (Palacios *et al.*, 1988). Los genes estructurales de la hidrogenasa de *B. japonicum* están codificados en un operón simple (Sayavecho-sot *et al.*, 1988). Al comparar la secuencia de genes que codifican a la hidrogenasa de distintos microorganismos se observa una gran homología (Lealer *et al.*, 1988; Reere *et al.*, 1989). Sin embargo, al transferir el cósmido pHU52 que contiene el genoma de la hidrogenasa a cepas de *R. meliloti* y *R. trifolii*, se observa una actividad hidrogenasa pequeña, indicando que el fenotipo HUP no se ha integrado establemente en el cromosoma del huésped.

### 3.4. Nodulinas

La formación de los nódulos está acompañada de la expresión de genes específicos de plantas, denominados nodulinas (Sengupta-Gopalan *et al.*, 1986; Govers *et al.*, 1987; Gloude-mans *et al.*, 1987). Pueden clasificarse en nodulinas tempranas y tardías dependiendo del momento de expresión durante el desarrollo del nódulo. Los genes de plantas específicamente expresados en el estado de preinfección no pueden ser llamados nodulinas, según la definición, sin embargo, se incluyen dentro de las nodulinas tempranas puesto que la expresión de estos genes está ligada al nódulo (Gloude-mans *et al.*, 1989). Los genes que codifican a las nodulinas tempranas se denominan ENOD y los correspondientes a las nodulinas tardías NOD (Nap y Bissel-nig, 1989) que pueden ir precedidos por las iniciales

del género y de la especie de la planta. Cuando se obtiene la proteína o su producto de traslación *in vitro* se indica la nodulina por la letra N-seguida de las iniciales de la especie vegetal y el peso molecular determinado por SDS-PAGE, también se puede adicionar la función bioquímica si se conoce (VanKammen, 1984). Se diferencian de las proteínas bacteroidales porque son sintetizadas en ribosomas 80S por ARN-poly A<sup>+</sup>. Otra evidencia adicional del origen vegetal de las nodulinas es que el ARNm que las codifica es complementario del ADN de la planta.

En el estado de preinfección se han detectado dos genes RH-42 y RH-44, que codifican dos proteínas de 42 y 44 kDa respectivamente, que están involucradas en la diferenciación y encurvamiento del pelo radical (Gloude-mans *et al.*, 1989). El proceso de infección está acompañado por la identificación de dos nodulinas en guisante pPsENOD-12 y pPsENOD-5 (Scheres *et al.*, 1990). La primera es una proteína formada por dos pentapéptidos iguales ricos en prolina y unida a componentes de la pared celular. Esta nodulina, que se expresa en las células que crecen en el cordón de infección y en las que están delante el ápice del cordón de infección, está implicada en la formación del primordio nodular (Scheres *et al.*, 1990). La segunda es una proteína rica en prolina, alanina, glicina y residuos de serina, unida a la lactato arabinosa. Solo se expresa en las células que contiene el cordón de infección (Knox *et al.*, 1989) aunque está presente en las células infectadas iniciales del nódulo (Scheres *et al.*, 1990). Esta proteína funciona tanto en la preinfección como en el crecimiento del cordón de infección y en la proliferación bacteriana. Además, en guisante se han detectado otras dos nodulinas, la PsENOD-3 y la PsENOD-14, ambas son metaloproteínas, con un peso molecular de 6 kDa y exclusivamente localizadas en las células infectadas del nódulo (Scheres *et al.*, 1989). Por último se ha identificado una última nodulina en guisante, la PsENOD-2 (Scheres *et al.*, 1991), que guarda homología con la pGmENOD-2 de soja (Bisselina *et al.*, 1991). Ambas proteínas tienen dos pentapeptidos iguales con dos residuos de prolina cada uno, el producto que forman está involucrado en la formación del parénquima nodular (Vandrwiold *et al.*, 1990) y en consecuencia en la formación de la barrera de difusión al oxígeno sugerida por Tjepkeme y Jocum (1974) y Willy (1986). El producto formado está involucrado en la formación del parénquima nodular (Van der Wiold *et al.*, 1990). En *Glycine max* se han identificado otras 3 nodulinas más, pGmENOD-13, pGmENOD-40 y pGmENOD-55 (Bisselina *et al.*, 1991).

Las nodulinas tardías han sido detectadas en nódulos de todas las leguminosas estudiadas entre las que se incluyen, alfalfa (Maxwell *et al.*, 1989), judía (Ronis *et al.*, 1985), trebol (Kneen *et al.*, 1984), altramuz (Carroll *et al.*, 1986), guisante (Cregan y Keyser, 1986),

soja (Bergensen y Nutman, 1957), haba (Phillips *et al.*, 1986) y la tropical *Sesbania* (Duc y Picard, 1986). Consecuentemente, las nodulinas tardías están relacionadas con el proceso de la fijación de nitrógeno simbiótica por lo que se consideran nodulinas metabólicas.

A nivel del transporte de metabolitos a través de la membrana peribacteroidea, se han implicado cuatro nodulinas, una se ha identificado como la colina-quinasa II, responsable de la integridad de la membrana peribacteroidea (Grierson y Corey, 1988), otra clasificada como N-24, se localiza en la misma membrana sin función conocida, la tercera conocida como N-26 se relaciona con el transporte entre la célula huésped y el bacteroide (Fischer y Hennecke, 1987) y la última, caracterizada en *Glycine max* (Sheeny *et al.*, 1987), se ha denominado N-23 y es miembro de una pequeña familia de 5 genes todos ellos caracterizados.

La leghemoglobina, que constituye casi el 20% de la proteína total soluble del nódulo, se considera una nodulina metabólica que contribuye a crear las condiciones requeridas para la fijación de nitrógeno, ya que facilita la difusión del oxígeno al bacteroide (Sheehy *et al.*, 1985). Las leghemoglobinas están codificadas por más de un gen, así en el genoma de soja se han caracterizado cuatro genes y varios pseudogenes (Brison, 1982).

En el metabolismo del carbono en nódulos se ha detectado que la subunidad de la sacarosa-sintasa nodular es la nodulina Ngm-1200 (Thummler y Verna, 1987). También se ha comprobado al estudiar las isoenzimas de la PEP-carboxilasa que se identificó una banda de actividad en raíz y dos bandas en nódulos de alfalfa, guisante y soja. En judía hay dos bandas en raíz y 3 bandas en nódulos, eso implica que la banda adicional observada de la PEP-carboxilasa puede ser considerada de una nodulina (Deroche y Carroll, 1989).

Otras dos nodulinas tardías se han descrito en el proceso de asimilación del amonio en nódulos de leguminosas, que tiene lugar, prioritariamente, por las enzimas del ciclo GS/GOGAT. Ambas proteínas se expresan específicamente en nódulos. Se pueden distinguir dos tipos de GS, la que se expresa como proteína específica del nódulo (GS<sub>n</sub>) y aquella cuya expresión se incrementa con la simbiosis (Farde y Cullimore, 1989). La expresión de la GS<sub>n</sub> está regulada por el balance carbono/nitrógeno en el nódulo (Chen *et al.*, 1990; Ortega *et al.*, 1990) y no por la disponibilidad del amonio (Hirel *et al.*, 1987).

Los nódulos de alfalfa expresan una NADH-GOGAT y los de judía dos isoenzimas, de las cuales una de ellas se considera específica del nódulo, la NADH-GOGAT II (Anderson *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990), sin embargo está en discusión su consideración de nodulina, puesto que estas dos enzimas son inicialmente expresadas independientemente de la inducción de la nitrogenasa y en nódulos no fijadores sólo expresan menos del 15% de su actividad. Sin embargo Egli *et al.* (1989) y Chen *et al.* (1990) determinan que la fijación simbiótica es esencial para la inducción máxima de la NADH-GOGAT.

También se describen en la síntesis de asimilados nitrogenados exportados de los nódulos. En las leguminosas de origen tropical que exportan ureidos se ha identificado una nodulina denominada uricasa II, caracterizada en nódulos de judías (Padilla *et al.*, 1987) y soja (Nguyen *et al.*, 1985). Bergmann *et al.* (1983) la denominaron inicialmente n-uricasa o Ngm-35 y la caracterizaron como una subunidad de 33kDa, siendo la segunda proteína más abundante del nódulo. Esta uricasa no presenta homología con los dos sistemas de uricasa que existen en raíces noduladas de soja. Se localiza en las peroxisomas de las células no infectadas del nódulo. La secuencia analítica no revela información de cómo se transporta al peroxisoma aunque la existencia de dos dominios hidrofóbicos en la secuencia de aminoácidos puede facilitar el transporte a través de la membrana peroxisomal (Nguyen *et al.*, 1985). La expresión inicial de esta nodulina no depende de la fijación activa de nitrógeno (Sánchez *et al.*, 1987) sino de bajas concentraciones de oxígeno. Esto sugiere a los autores citados que en las nodulinas tardías hay dos tipos de genes unos regulados por el desarrollo del nódulos y otros por condiciones ambientales.

#### 4. METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN PLANTAS.

El nitrógeno inorgánico es utilizado por las leguminosas mediante los procesos de fijación de nitrógeno y asimilación de nitrato. Aún, cuando el nitrógeno atmosférico es mucho más abundante en la naturaleza que el nitrato, la cantidad de nitrógeno orgánico producido por la asimilación de nitrato es cien veces superior al producido por la fijación biológica debido a la amplia gama de organismos capaces de asimilarlo (algas, hongos, plantas superiores)(Guerrero *et al.*, 1981).

Las leguminosas son las únicas plantas superiores que pueden utilizar el nitrógeno atmosférico y el nitrógeno inorgánico presente en el suelo. Cuando ambas fuentes de nitrógeno están disponibles para las plantas, la contribución de nitrógeno fijado a la nutrición de la planta varía con las condiciones de cultivo, con el genotipo de la planta (Dua, 1980) y con el contenido de nitrógeno inorgánico en el suelo (Bello *et al.*, 1980). En soja, el porcentaje de nitrógeno procedente de la fijación varía desde un 25% en suelos fértiles, a un 80% en suelos áridos (LeRue y Paterson, 1981). En alfalfa, entre el 40% y el 70% del nitrógeno total procede de la simbiosis (Hechel *et al.*, 1981), mientras que en haba el porcentaje se situó alrededor del 87% (Richards y Soper, 1978).

##### 4.1. Asimilación de nitrato

El nitrato junto con el amonio son las formas más usuales de nitrógeno que

absorben las plantas. Además de los fertilizante y de la lluvia, el nitrato y el amonio pueden proceder también de la mineralización de la materia orgánica del suelo. El nitrato absorbido del suelo es transportado a las hojas donde prioritariamente se reduce por acción de dos enzimas, la nitrato reductasa y la nitrito reductasa, para formar amonio. El proceso de reducción del nitrato consume ocho electrones (Stewart, 1988).

La nitrato reductasa requiere dos electrones que son donados por el NADH preferentemente, aún cuando puede utilizar otros donadores de electrones. En raíces de cebada se ha encontrado una nitrato reductasa biespecífica NAD(P)H junto con la específica del NADP, mientras que en hoja sólo se ha encontrado la NADH-NR (Dailey *et al.*, 1982). Las propiedades cinéticas, bioquímicas y fisiológicas estudiadas en el enzima foliar y radical son semejantes (Oji *et al.*, 1987). Es interesante indicar, que en soja se han separado y parcialmente caracterizado tres nitrato reductasa, una inducible y dos constitutivas, de las cuales una es dependiente del NADPH y otra del NADH (Streit *et al.*, 1987). La nitrato reductasa constitutiva se afecta directamente por los productos de la fijación biológica, los ureidos, más que por el metabolismo del nitrato *in vivo* (Li y Gresshoff, 1990). Funcionalmente parece localizarse soluble en el citoplasma (Beevers y Hajeman, 1980). Sin embargo, por inmunolocalización se ha detectado en cloroplastos de algas (Lopez-Ruiz *et al.*, 1985) y de espinacas (Ramachi *et al.*, 1987). Se puede pensar que la nitrato reductasa tiene epitopos comunes con algunas enzimas abundantes en el cloroplasto que inducirían a su aparente detección en dichos orgánulos. Schuster *et al.* (1989) informan de cuatro formas diferente de nitrato reductasa, una de ellas dependiente del "factor plastídico", dos son citosólicas y la otra depende del amonio. Recientemente se ha descrito en raíces de maíz una NR-particulada asociada a membranas (Ward *et al.*, 1988; 1989).

La presencia de un sistema activo de reducción de nitrato en nódulos de leguminosas se demostró por primera vez en soja (Evans, 1954). En los nódulos pueden separarse dos fracciones, la citosólica de origen vegetal y la bacteroidea que es de origen microbiano, en ambas puede darse la reducción de nitratos. Las leguminosas de los géneros *Phaseolus*, *Lotus*, *Pisum* y *Vicia* expresan actividad nitrato reductasa solo en la fracción citosólica de los nódulos (Manhast y Wong, 1979; Becana *et al.*, 1985; Caba *et al.*, 1990). Otros géneros como *Glycine*, *Medicago* y *Vigna* muestran actividad nitrato reductasa tanto en citosol como en bacteroide (Streeter, 1982; Becana y Sprent, 1987; Becana y Bedmar, 1990) quizás porque en estos nódulos el nitrato no tiene acceso a la región bacteroidal, quedando restringida su localización a los tejidos corticales del nódulo (Sprent *et al.*, 1987).

La reducción de nitrito a amonio, mediante una transferencia de seis electrones, está catalizada por la enzima denominada nitrito reductasa. El sustrato que utiliza este enzima raramente se acumula bajo condiciones normales en los tejidos vegetales, puesto que, la

nitrito reductasa invariablemente presenta unos valores mucho más elevados de actividad que la nitrato reductasa (Bray, 1987). Además, existe una coordinación perfecta entre esta enzima y los que secuencian la asimilación de amonio, con objeto de evitar la acumulación de amonio que podría inducir un síndrome tóxico. Weber *et al.* (1990) observan que el nivel de glutamina sintetasa es siempre mayor que la nitrito reductasa como medida de seguridad que evita la acumulación de amonio.

La nitrito reductasa en tejidos fotosintéticos esta asociada a cloroplastos (Beever y Hageman, 1980) y utiliza la ferredoxina como donador de electrones. El nitrito también puede ser metabolizado en raíz donde la nitrato reductasa se asocia prioritariamente a plastidios (Susuki *et al.*, 1981) y esporadicamente al citoplasma (Fischet y Klein, 1988), utilizando piridin nucleotidos, procedentes de la vía de las pentosas fosfato, como donadores de electrones (Bowsher *et al.*, 1988).

Se ha detectado actividad nitrito reductasa en ambas fracciones nodulares, citosólica (Hunter, 1985) y bacteroidal (Rigaud, 1976; Streeter, 1985; Becana, 1985), aún cuando los datos bibliográficos de la existencia de actividad nitrito reductasa en esta última fracción son contradictorios (Stephens y Neyra, 1983; Giannakis *et al.*, 1988).

### 4.3. Asimilación de amonio

La asimilación de amonio en plantas ha sido revisada ampliamente por Mifflin y Lea (1980), Stewart *et al.* (1980), Lea *et al.* (1990) y Kumar y Arbol (1990) entre otros autores. La procedencia del amonio para la planta puede ser muy diversa: a) como tal, se puede absorber del medio externo directamente por la raíz; b) en hojas y otros organos de la planta, procede de la asimilación del nitrato mediante los enzimas mencionados; c) en nódulos de leguminosas, se considera el primer producto estable de la fijación del nitrógeno atmosférico (Bergensen y Turner, 1957), localizado en el bacteroide; d) en semillas y tejidos senescentes, del catabolismo de las aminos, glutamina y asparragina; e) en leguminosas tropicales, de la urea procedente del catabolismo de ureidos (Shelp *et al.*, 1985); f) en general, puede proceder del catabolismo de los aminoácidos, arginina, cisteina, serina triptófano, fenilalanina (Mazelis, 1980; Rennenberg, 1984) y por último g) como proceso generalizado en las plantas, de la fotorrespiración (Keys *et al.*, 1978).

#### 4.3.1. Ciclo glutamina sintetasa-glutamato sintasa

Numerosas evidencias indican que el ciclo de la glutamina sintetasa y glutamato sintasa opera activamente en plantas superiores desde que Tempest *et al.* (1970) descubriera



la glutamato sintasa. Los experimentos realizados con  $^{15}\text{N}$  (Lewis y Pate, 1973), con  $^{13}\text{N}$  (Wolk *et al.*, 1976; Meeks *et al.*, 1978), con inhibidores metabólicos (Miflin y Lea, 1980) o mediante el aislamiento de orgánulos (Wallsgröwe *et al.*, 1979) lo pusieron de manifiesto.

Una característica de esta ruta metabólica es su naturaleza cíclica en la cual el glutamato actúa como aceptor de amonio y como producto final de su asimilación. Rhodes *et al.* (1980) lo denominaron ciclo de la glutamato sintasa. El amonio es inicialmente incorporado en el carbono  $\gamma$  del ácido glutámico formándose la amina correspondiente, glutamina, por acción de la glutamina sintetasa que requiere ATP. Esta reacción está bloqueada por un inhibidor específico del enzima, la metionina sulfoximina, provocando un rápido aumento de la concentración de amonio en el nódulo (Oyhama y Kumozawra, 1980). Esta incorporación del amonio es altamente efectiva debido a la baja  $K_m$  del enzima para el amonio y a la hidrólisis del ATP que favorece el equilibrio de la reacción en este sentido.

El segundo enzima, la glutamato sintasa (glutamina oxoglutarato aminotransferasa), es la encargada de transferir el grupo amino de la glutamina al carbono 2 (posición  $\alpha$ ) del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico para formar glutamato. Es una aminación reductiva que utiliza NAD(P)H o ferredoxina reducida como donadores de electrones. El empleo de  $^{15}\text{N}$  y la azaserina, inhibidor de la transferencia de grupos amino, han demostrado el funcionamiento de este enzima (Robertson y Farnden, 1980).

La asimilación de amonio en plantas superiores es un proceso que no puede separarse del metabolismo energético general de la planta ni del metabolismo del carbono en particular, ya que para que funcione este ciclo hace falta ATP, poder reductor y metabolitos carbonados (Miflin y Lea, 1980).

### Glutamina sintetasa

En plantas superiores la glutamina sintetasa es una proteína octomérica con un peso molecular de 350 kDa y con subunidades de 38-45 kDa, dispuestas en dos tandas paralelas formando un tetramero planar. El pH óptimo del enzima depende del catión divalente empleado en la reacción, si es el  $\text{Mg}^{2+}$  el pH es de 8.0 y si es el  $\text{Mn}^{2+}$  el pH usado es de 5.0. La actividad de este enzima se afecta por los cambios de  $\text{Mg}^{2+}$ , de la carga energética y del pH.

Se ha localizado en diferentes órganos de la planta, principalmente en las hojas de una amplia variedad de especies vegetales (Hired y Gadal, 1978). Durante el desarrollo de la semilla se ha identificado una glutamina sintetasa en el endospermo de maíz (Oaks *et al.*, 1979) similar a la enzima radical. Citológicamente se ha encontrado en cloroplastos (O'Neal y Joy, 1973) y en citoplasma (Miflin, 1974). Esta dual localización de la glutamina sintetasa

indica que hay más de una forma del enzima.

También ha sido aislada y purificada en nódulos de distintas leguminosas (Cullimore *et al.*, 1991; Lara *et al.*, 1984; Tineey *et al.*, 1987; Egli *et al.*, 1991). De hecho, la glutamina sintetasa contribuye al 2% de la proteína soluble de los nódulos (MaFarland *et al.*, 1976). Se localiza dentro de la corteza interna de nódulos de *Alnus* (Hirel *et al.*, 1982) y en bacteroides (Plandke *et al.*, 1977).

Las múltiples isoformas de la glutamina sintetasa se han identificado en muchas especies vegetales (McNally y Hirel, 1983). La identificación de dos isoformas de esta enzima, por vez primera, la realizaron Stasiewicz y Dunham (1979) por cromatografía de intercambio iónico, que las denominaron GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub>. Las raíces solo contienen una isoforma similar a la GS<sub>1</sub> (Mann *et al.*, 1979) que ha sido definida como GS<sub>R</sub>. Los experimentos realizados con técnicas de inmunofluorescencia han demostrado una compartimentación dual de esta actividad enzimática dentro de la hoja (McNally y Hirel, 1983), estando la GS<sub>1</sub> restringida al citosol y la GS<sub>2</sub> al cloroplasto.

McNally *et al.* (1983) clasifican a las plantas en cuatro categorías basándose en la distribución de las isoformas de GS: a) el primer grupo incluye plantas que solo contienen la GS<sub>1</sub>, son plantas etioladas o cloróticas-parasitadas (Hopfner *et al.*, 1990), b) el segundo grupo solo tienen GS<sub>2</sub>, como plantas de espinaca, tabaco, mostaza (Hopfner *et al.*, 1988), c) el tercer grupo poseen ambas isoformas, estando la isoforma GS<sub>1</sub> en menor proporción, d) el cuarto grupo posee también ambas isoformas, estando el componente GS<sub>1</sub> en mayor proporción, perteneciendo a este grupo la mayoría de las plantas C<sub>4</sub> y tropicales. En plantas C<sub>4</sub>, la relación es similar en células de la vaina y del mesófilo (Yamaya y Oaks, 1987) lo que le confiere una ventaja en términos de eficiencia de la utilización del nitrógeno. La proporción relativa de ambas isoformas depende de diversos factores como la luz (Hired *et al.*, 1982), el estado de desarrollo (Tobin *et al.*, 1985) o la forma de nitrógeno suministrada a la planta (Mack y Tischner, 1990).

En virtud de su localización subcelular se ha sugerido que la GS<sub>1</sub> puede funcionar en la asimilación de amonio, en oscuridad (McNally *et al.*, 1983), procedente de la degradación de proteínas, de la reducción de nitratos o de la absorción del suelo (Lea y Robinson, 1990). Mientras que la GS<sub>2</sub> tiene un papel predominante en la asimilación del amonio procedente del proceso fotorrespiratorio. Wallsgrave *et al.* (1987) con el uso de mutantes y estudiando los cambios de nivel de los polipéptidos de ambas isoformas y de sus correspondientes ARN<sub>m</sub>, han deducido que la GS<sub>1</sub> es responsable de la síntesis de amonio en tejidos senescentes (Kamachi *et al.*, 1992).

Las tres isoformas exhiben propiedades cromatográficas diferentes y específicas. La isoforma cloroplastídica es poco termoestable y sensible a la inactivación por N-

etilmaleimida y otras moléculas con grupos sulfidrilo (Stewart *et al.*, 1988). Por utilización de anticuerpos específicos se ha demostrado que es distinta de la isoforma citosólica (Hired *et al.*, 1987). La isoforma citosólica presenta una cinética de Michaelis-Menton semejante a la isoforma radical, pero distinta a la cloroplastídica (Smirnoff y Stewart, 1987). Se asume que las diferentes isoformas están codificadas por diferentes, pero relacionados, genes y que los distintos genes se expresan específicamente en algunos órganos (Tingey *et al.*, 1987). La comparación inmunológica entre ambas isoformas ha demostrado un cierto grado de similitud estructural, ya que son reconocidas de forma cruzada por anticuerpos policlonales frente a una de ellas. El análisis de la secuencia de aminoácidos estima una homología del 75% para las isoenzimas citosólica y cloroplastídica.

Las diferentes isoformas de la glutamina sintetasa están codificadas por una pequeña familia de genes que se han encontrado en diferentes partes de la planta (Hired *et al.*, 1987; Forde *et al.*, 1989; Walter y Coruzzi, 1989; Edwards *et al.*, 1990). El patrón de expresión de los genes que codifican estas isoformas se ha conocido por su expresión en plantas transgénicas (Edwards *et al.*, 1990). El gen que codifica la forma cloroplastídica (GS<sub>2</sub>) en *Pisum sativum* es específicamente expresado en células fotosintéticas de plantas transgénicas de tabaco, mientras que la glutamina sintetasa citosólica es activa en los elementos del floema de las mismas plantas transgénicas. En *Phaseolus vulgaris* la familia de genes de la glutamina sintetasa está compuesta de 5 genes, denominados *gen*α, *gen*β, *gen*γ y *gen*δ, los 3 primeros codifican tres polipeptidos de la GS citosólica (Lara *et al.*, 1984; Bennett *et al.*, 1989), el cuarto gen codifica la unidad δ de localización plastidial (Lightfoot *et al.*, 1981), existe un quinto gen (*gen*ε) que puede no ser expresado.

En nódulos de leguminosas Cullimore *et al.* (1983) informaron por vez primera la existencia de dos isoformas de glutamina sintetasa, denominadas GS<sub>n1</sub> y GS<sub>n2</sub>. Lara *et al.* (1983) demostraron que el incremento de la actividad de la glutamina sintetasa en el desarrollo de los nódulos se correlaciona con la producción de GS<sub>n1</sub>. La actividad de GS<sub>n2</sub> permanece constante durante el desarrollo del nódulo y es virtualmente idéntica a la forma radical de glutamina sintetasa (Cullimore *et al.*, 1983). Al examinar la composición de las subunidades de las isoenzimas de glutamina sintetasa de nódulos, Bennett y Cullimore (1989) concluyen que las subunidades aisladas pueden ensamblarse formando una variedad de isoenzimas homooctamera y heterooctamera γ, γ/β y β que constituyen 3 de los cuatro polipéptidos detectados para la enzima nodular, considerando que la cuarta actividad coincide con el isoenzima plastidial compuesto solo de subunidades δ. Padilla *et al.* (1987) informaron que los nódulos pueden tener el polipéptido α, sin embargo, en nódulos maduros la cantidad esta es muy baja y virtualmente indetectable si se compara con la

cantidad de polipéptido  $\beta$  y  $\gamma$ . El rango de combinación de los polipéptidos puede generar diferentes isoenzimas, al variar al proporción de ellos (Cae y Wong, 1990; Green y Wong, 1992). La  $GS_{\alpha 1}$  esta compuesta por el polipéptido  $\gamma$  y la isoforma  $GS_{\alpha 2}$  por el polipeptido  $\beta$ , que también se expresa en raíces y hojas (Forde *et al.*, 1989).

Inicialmente la expresion del polipeptido  $\gamma$  de esta enzima se considera una nodulina (Egli *et al.*, 1989) independiente de la actividad nitrogenasa (Padilla *et al.*, 1987) aun cuando su inducción óptima requiere una activa fijación de nitrógeno. Al estudiar la expresión del *gen $\alpha$*  y del *gen $\beta$*  en plantas transgénicas de *Lotus corniculatus* se observó que el *gen $\gamma$*  se expresa en la zona infectada del nódulo maduro donde tiene lugar la asimilación de amonio, mientras que el *gen $\beta$*  se expresa en el interior del cortex (Forde *et al.*, 1989). Esta diferencial expresión de los genes de la GS sugiere que las distintas isoformas pueden condicionar diferentes funciones en el metabolismo del nitrógeno (Edwards *et al.*, 1990).

Los genes de la GS parecen estar regulados por diferentes factores, por la luz (Edwards y Coruzzi, 1989), por el fitocromo (Sakamoto *et al.*, 1990), y por la disponibilidad de amonio (Hirel *et al.*, 1987). Concretamente el amonio procedente de la fijación de nitrógeno regula la expresión del gen *gen $\gamma$*  (Miao *et al.*, 1990) en los tejidos infectados del nódulo, sin embargo no difunde al cortex radical por lo que no controla la expresión del *gen $\beta$*  (Miao *et al.*, 1991). Los niveles de anhídrido carbónico también regulan la expresión del *gen $\gamma$*  (Ortega *et al.*, 1992).

#### 4.3.2. Glutamato sintasa

En plantas superiores se han identificado tres formas distintas de glutamato sintasa (Susuki *et al.*, 1986), una dependiente de la ferredoxina, Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1), otra dependiente del NADH, la NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) y otra dependiente del NADPH, la NADPH-GOGAT (EC 1.4.1.13), como donadores de electrones. Ha sido necesario separar las distintas actividades mediante cromatografía de exclusión molecular (Cullimore y Sims, 1981) y utilizar técnicas inmunológicas para considerarlas proteínas diferentes. Se dispone de una bibliografía reducida de esta enzima debido a que su labilidad durante su manejo *in vitro* y porque existe menor cantidad, aproximadamente diez veces menos que la glutamina sintetasa.

La forma dependiente de la ferredoxina, Fd-GOGAT, se localiza en el estroma de los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos (Wallsgrave *et al.*, 1979), en algas verdes (Cullimore y Sims, 1981) y en cianobacterias (Botella *et al.*, 1988). También se ha descrito que se encuentra en el parenquima xilemático y en células de la epidermis (Botella *et al.*,

1988), incluso se localiza en plastidios de raíz (Susuki *et al.*, 1989). En nódulos de soja se ha desarrollado una GOGAT muy similar a este enzima de hoja (Susuki *et al.*, 1986), aunque la fuente de poder reductor de este enzima en tejidos no verdes es problemática (Lee, 1980). La existencia de la Fd-GOGAT enzima se confirmó definitivamente cuando se obtuvieron mutantes que carecían de la capacidad de reasimilar el amonio liberado en la fotorrespiración (Lea *et al.*, 1984).

La glutamato sintasa dependiente de piridín nucleóticos se ha encontrado en raíces (Oaks y Hirel, 1985), en cultivo de tejidos (Lenee y Chapeau, 1989) en cantidades muy pequeñas, en hojas verdes de cebada y guisante (Wallsgrave *et al.*, 1982) aunque su actividad es muy escasa (Hecht *et al.*, 1987). También se ha detectado en cotiledones de leguminosas (Lee y Fowden, 1975) y en endospermo de maíz (Sodek y Silva, 1977). Se ha desarrollado en el parénquima xilemático (Botella *et al.*, 1985) y en plastidios de raíces (Susuki *et al.*, 1984). Clásicamente, esta enzima podía utilizar como coenzima tanto el NADH como el NADPH (Beevers y Storey, 1976). Sin embargo, hay evidencias que indican que la específica del NADPH opera en bacterias (Yelton y Yoch, 1981) mientras que en plantas superiores opera la dependiente del NADH.

En nódulos de *Phaseolus vulgaris* se han localizado dos isoformas denominadas NADH-GOGAT I y NADH-GOGAT II según el orden de elución en la columna de intercambio iónico, considerándose que esta última es específica del nódulo (Chen y Cullimore, 1989). En nódulos de alfalfa (Anderson *et al.*, 1989) y de altramuz (Boland y Benny, 1977) solo se ha detectado una isoforma. Ambos enzimas tienen una localización plastidial (Awonaike *et al.*, 1981; Boland *et al.*, 1982; Shelp *et al.*, 1983; Shelp y Atkins, 1984; Chen y Cullimore, 1989) pero mientras la NADH-GOGAT II se localiza casi exclusivamente en el tejido central del nódulo y representa la mayor parte de la actividad glutamato sintasa, la NADH-GOGAT I se encuentra tanto en el cortex como en la región central y con igual actividad específica. Se ha sugerido que la NADH-GOGAT II estaría restringida a las células infectadas participando en la asimilación del amonio producido en los bacteroides (Chen y Cullimore, 1988).

La F-dGOGAT ha sido purificada en algas verdes (Galvan *et al.*, 1984) y en algunas especies vegetales como, arroz (Susuki y Gadal, 1982), en hojas de espinaca (Hirasawa y Tamura, 1984), en tomate (Avila *et al.*, 1987) y en maíz (Sakakibara *et al.*, 1991). Es una enzima monomérica con un peso molecular de rango entre 146-170 kDa (Hirasawa y Tamura, 1984; Galvan *et al.*, 1984; Marquez *et al.*, 1986). Representa el 1% de la proteína total de la hoja. Además de a la azaserina, el enzima es muy sensible a aspartato y a la fofoserina (Avila *et al.*, 1987). La Fd-GOGAT es una flavoproteína con grupo S-Fe (Hirosowa y Tamina, 1984) contiene una molécula de FAD y una molécula de FMN, como

grupos prostéticos, 8 moléculas de Fe no hémico y 8 moléculas de S lável por molécula del monómero. Por dicroismo circular se ha asignado la configuración (3Fe-3S) a los centros S-Fe de la glutamato sintasa aislada de espinaca (Knaff *et al.*, 1991).

La enzima forma un complejo electrostáticamente establecido con la ferredoxina que involucra a los grupos cargados negativamente en la ferredoxina y parece producir dominios de unión similares a los presentes en los complejos de la ferredoxina de otros enzimas cloroplásticos (Knaff *et al.*, 1991; Hirasawa *et al.*, 1991). Al estudiar las propiedades de oxido-reducción del enzima se comprueba que las dos flavinas tienen el mismo potencial redox o difieren en algo menos de 30 mV (Hirasawa *et al.*, 1992), los centros (3S-3Fe) exhiben un potencial redox intermedio entre los centros de la ferredoxina tipo 4Fe-4S y tipo 2Fe-2S (Ackrell *et al.*, 1991).

La información genética de la Fd-GOGAT en cianobacterias es bastante escasa. La enzima fue detectada en *Nostoc* y *Anabaena* (Lea *et al.*, 1982). La purificación y caracterización de la glutamato sintasa dependiente de la ferredoxina en una cianobacteria se ha llevado a cabo recientemente por Marquez *et al.* (1992) proponiendo que la GOGAT cianobacteroidal pueda ser un ancestro de la GOGAT cloroplastidial de eucariotas debido a la gran similitud que existe en sus características, aún cuando existen algunas diferencias. El peso molecular de la proteína monomérica nativa está en el rango de 156-160 kDa. Tiene una molécula de FMN y no la de FAD por proteína nativa. La  $K_m$  para glutamina, ferredoxina y  $\alpha$ -oxoglutarato es de, 0.7 Mm, 7  $\mu$ M y 1.7 Mm, respectivamente. La azaserina y el 6-diazo-5 oxo L norleucina son potentes inhibidores.

Utilizando mutantes que carecen de esta enzima (Laysell y Calvin, 1989), han demostrado que esta actividad está íntimamente ligada a la asimilación del amonio liberado en la fotorrespiración (Kendall *et al.*, 1986). La actividad de esta enzima se incrementa con la luz (Busuki *et al.*, 1982) o bien está mediada por el fitocromo (Hecht *et al.*, 1988).

La Fd-GOGAT se considera una proteína estructuralmente distinta a la NADH-GOGAT encontrada en raíces, puesto que los anticuerpos no presentan reacción cruzada (Susuki *et al.*, 1987). Sin embargo se ha comprobado utilizando anticuerpos que la proteína aislada en hoja de arroz es semejante a la que se aísla en hoja etiolada (Susuki *et al.*, 1982).

Los estudios sobre la NADH-GOGAT son bastante escasos, puesto que es mucho menos activa que la Fe-GOGAT. La purificación y caracterización se ha podido llevar a cabo en determinados extractos vegetales realizados con, mutantes que carezcan de Fd-GOGAT (Morris *et al.*, 1988), cultivo de tejidos (Hayakawa *et al.*, 1990), tejidos etiolados (Matoh *et al.*, 1980), endospermo (Munitch, 1991) y cultivos de *Azospirillum brasilensis* (Vanony *et al.*, 1992). Con el enzima purificado procedente de cultivos de arroz se han

producido anticuerpos monoespecíficos frente a la NADH-GOGAT que no presentan reacción cruzada con el Fd-GOGAT procedente de hojas de arroz y células de arroz (Hayawana *et al.*, 1992).

La glutamato sintasa de nódulos se caracterizó y purificó por primera vez en altramuz (Boland, 1979). Es un monómero con un peso molecular aproximado de 230 kDa. Este dato fue confirmado por Anderson *et al.*, (1989) en nódulos de alfalfa. Probablemente se trata de una de las subunidades enzimáticas de mayor peso molecular que se conoce. La  $K_m$  para la glutamina, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el NADH es, 466  $\mu$ M, 33  $\mu$ M y 43  $\mu$ M, respectivamente. No es inhibida por la N-etilmaleimida, lo que indica que ni el hierro, ni el grupo sulfidrilo, ni los restos de histidina participan en el centro catalítico del enzima (Anderson *et al.*, 1990). Al estudiar las características cinéticas de ambas isoformas de NADH-GOGAT nodular se encuentran diferencias en la  $k_m$  para, la glutamina, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el NADH y también diferencias en el pH óptimo. Mientras que la NADH-GOGAT I exhibe un amplio rango de pH centrado en torno a 8, la NADH-GOGAT II exige un rango de pH muy estrecho cercano al 8.5.

Por dicroísmo circular se ha asignado la configuración (4Fe-4S) a los centros FE-S del enzima. La cinética enzimática sugiere que el enzima interacciona con sus sustratos en sitios catalíticos diferentes. Por analogía con otros enzimas dependientes de piridín nucleótidos (Blankenhorn, 1976), una de las flavinas es el sitio de unión del NADH como único aceptor de electrones. La transferencia de electrones ocurre vía centro (Fe-S) a la segunda flavina donde tiene lugar la reducción del ácido-imino con la producción de L-glutamato (Vanony *et al.*, 1991).

La actividad de la NADH-GOGAT en nódulos se estimula enormemente con el desarrollo del nódulo (Boland, 1978; Great y Vance, 1981) y decae con la inhibición de la fijación de nitrógeno (Groat y Vance, 1981). Además, la NADH-GOGAT nodular es muy poco activa en nódulos inefectivos (Vance y Johnson, 1983). Durante la nodulación ambas isoenzimas se incrementan pero más intensamente la NADH-GOGAT II (Chen y Cullimore, 1988).

Los anticuerpos frente a la NADH-GOGAT de nódulos de alfalfa, reconocen a la NADH-GOGAT de nódulos de otras especies de leguminosas, aunque no presentan reacción cruzada con la NADH-GOGAT de raíces y hojas de alfalfa. La isoforma de NADH-GOGAT II específica de los nódulos parece estar inducida en la raíz como respuesta a la infección con *Rhizobium* (Anderson *et al.*, 1989) y no se expresa en otros órganos, mientras que la isoforma NADH-GOGAT I si se detecta en otros órganos en *Phaseolus vulgaris* (Chen *et al.*, 1990).

## Glutamato deshidrogenasa

En plantas superiores, la principal evidencia a favor del papel de la glutamato deshidrogenasa en la asimilación del amonio, era su capacidad de catalizar la síntesis del glutamato *in vitro* mediante la unión del NADH al  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio, liberando glutamato y NAD (Hartman y Ehmke, 1980; Oaks y Hirel, 1980; Pahlich y Joy, 1981; Tichner, 1984; Yamaya *et al.*, 1986). Sin embargo, se asume que es un enzima catabólico (Robinson *et al.*, 1991) y no interviene en la asimilación de amonio debido a su baja afinidad por el sustrato (Wallsgrave *et al.*, 1983) ya que presenta una  $K_m$  para el amonio de 10-80 mM (Mifflin y Lea, 1953). No obstante, Pahlich y Gerliz (1980) encuentran que la  $K_m$  es bifásica y que depende de la concentración de amonio, además el enzima está unido a membranas (Yamaya *et al.*, 1984) sugiriéndose que la  $K_m$  estudiada *in vivo* puede ser distinta a la detectada *in vitro*.

Su localización es priotariamente mitocondrial (Stewart *et al.*, 1980). Una pequeña fracción de la actividad total se ha detectado en cloroplastos y difiere de la mitocondrial en que utiliza NADPH y en su afinidad por el amonio (Srivastava y Singh, 1987). También se ha detectado y purificado en diversos órganos y tejidos vegetales incluyendo semillas, raíces, hojas, epicotilos y cotiledones (Itagaki *et al.* 1988).

La glutamato deshidrogenasa generalmente utiliza como coenzima el NADH, aunque también funciona con el NADPH (Martínez-Bilbao *et al.*, 1987). El peso molecular es de 252 kDa (Loulakakis y Roubelakis-Angelakis, 1990). Se han descrito siete isoenzimas que pueden aumentar con el amonio en la planta (Nagel y Hartman, 1980). De los siete isoenzimas la primera y la séptima son homohexámeros y las restantes son híbridas. Cada isoenzima tiene una función catabólica o anabólica variable (Cammaerts y Jacobs, 1985). Se comporta como un enzima alostérico en el que sus propiedades se modifican según la disponibilidad del ión calcio que actúa como efector (Yamaya *et al.*, 1984). La reacción de aminación se activa con 100 mM de calcio mientras que la reacción de desaminación no se afecta con el calcio. El pH óptimo para la aminación es de 8.0 y para la desaminación 9.3 (Loulakakis y Roubelakis-Angelakis, 1990).

La función de la glutamato deshidrogenasa se centra en la reasimilación del amonio y en la síntesis de glutamato en la mitocondria. Puede tener un papel complementario al ciclo de la glutamato sintasa (Srivastara y Sing, 1987; Rhodes *et al.*, 1989). Aún cuando la constante de Michaelis-Menton es muy elevada (Stewart *et al.*, 1980), la gran cantidad de enzima presente en los tejidos vegetales puede ser adecuada para asimilar amonio, incluso cuando la concentración intracelular del sustrato sea baja. Sin embargo, cuando se utilizan inhibidores del ciclo GS/GOGAT, como la metilsulfoximina y asumiendo que estos



inhibidores no afectan a la glutamato deshidrogenasa, se observa que se acumula el amonio y no se incorpora a los aminoácidos (Berger y Fock, 1983; Rhodes *et al.*, 1989).

Otra alternativa funcional se relaciona con la oxidación del glutamato para proporcionar esqueletos carbonados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Thomas, 1978). Mediante la técnica de RMN ha sido posible demostrar que en la incorporación primaria del amonio no está involucrada la glutamato deshidrogenasa, pero este enzima es activa en la oxidación del glutamato en respuesta a una deficiencia de carbono. El papel catabólico de la enzima implica un mecanismo de regulación para el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Robinson *et al.*, 1991).

El aumento de la actividad glutamato deshidrogenasa en la senescencia de la planta, es una característica observada por diversos autores (Lauriere *et al.*, 1983; Cammaerts y Jacobs, 1984). En este estado se produce una falta de nitratos, se acumulan aminoácidos y azúcares soluble (Chaillou *et al.*, 1986), lo que entraña una activación de la glucólisis (Márquez *et al.*, 1983) y por tanto un aumento de la formación de NADH. Todo esto estimula el funcionamiento de la glutamato deshidrogenasa, favoreciendo la eliminación del amonio y proporcionando una función detoxificante del enzima. La actividad aminativa de este enzima incrementa con la edad de la planta (Tirado *et al.*, 1990a) sobre todo cuando la actividad glutamina sintetasa del cloroplasto decae (Tirado *et al.*, 1990b). Loyola-Vargas *et al.* (1988) también la detecta en los primeros estadios de crecimiento de las plantas antes de que la planta adquiera una capacidad fotosintética plena.

Ante condiciones adversas y de estrés, el comportamiento de este enzima es singular. Muñoz-Blanco y Cárdenas (1989) trabajando en diferentes condiciones tróficas de estrés han demostrado que la actividad de la glutamato deshidrogenasa es adaptativa, estando implicada en el mantenimiento de los niveles de glutamato intracelular, que no pueden ser mantenidos por el ciclo GS/GOGAT. La actividad de la glutamato deshidrogenasa en condiciones de estrés ha sido descrita por Srivastava y Singh (1987), Miranda-Ham y Loyola-Vargas (1988) y por Smirnoff y Stewart (1988) entre otros autores.

## 5. LIMITACIONES DEL USO DE LAS LEGUMINOSAS: SALINIDAD

Numerosas especies de leguminosas se utilizan tanto en agricultura como silvicultura, para consumo humano, para piensos y forrajes y para el mantenimiento de suelos y recuperación de terrenos. Además, estos cultivos suministran nitrógeno al suelo merced a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Peoples y Craswell, 1992). El efecto beneficioso de las leguminosas grano y forrajeras pueden ser substancial en la fertilidad del suelo (Robson, 1989). Sin embargo, los cultivos de leguminosas pueden verse limitados por

una serie de factores ambientales adversos que merecen ser revisados.

Se ha estimado que más de  $40 \cdot 10^6$  hectáreas de suelo de las  $220 \cdot 10^6$  cultivables están afectadas por la salinidad, si a este dato se añade que el desierto ocupa una extensión aproximada de  $1600 \cdot 10^6$  Ha de suelo, se puede suponer que un 40% del suelo son áreas con potenciales problemas salinos. La mayor parte de esas áreas están confinadas en la región mediterránea (World Resources, 1987). A pesar de estar ampliamente distribuidos los suelos salinos, el efecto de la salinidad en leguminosas y en la fijación de nitrógeno ha sido poco estudiado.

El efecto de los suelos salinos en el crecimiento de las plantas ha sido el foco de investigación en este siglo, puesto que el estrés salino es el mayor estrés limitante en la productividad de los cultivos. La tolerancia a la sal de las plantas es un complejo fenómeno que involucra cambios en la morfología y en los procesos bioquímicos y fisiológicos de las mismas (Greenway y Munns, 1980; Hanson y Hitz, 1982)

### 5.1 Efecto de la salinidad en la planta

Los dos efectos identificados como la causa probable de la salinidad en las plantas son, el efecto iónico y el efecto osmótico. El efecto iónico (Levitt, 1980) produce una alteración en, la absorción de nitrógeno del suelo, el transporte del nitrógeno asimilado y la proteínosíntesis (Pessarkly y Turcker, 1985). Además, afecta al transporte de iones minerales en la planta y disminuye la velocidad de fotosíntesis neta en las mismas. El efecto osmótico está asociado con la carencia de extensión de la pared celular y con el retraso del crecimiento de las plantas (Lewis *et al.*, 1989).

Por otra parte se ha demostrado que el peso seco de las plantas disminuye y que la relación raíz/tallo incrementó con el aumento de la concentración de NaCl en el medio de crecimiento (Seemann y Critchley, 1985). Sin embargo, según el tipo de planta y el tipo de especie, el comportamiento ante las condiciones de estrés salino es bastante diferente (Pessarkli *et al.*, 1989). Hay que tener en cuenta que la respuesta de las plantas a la salinidad depende, del grado de estrés, del estado de crecimiento, del tipo y gama de elementos nutritivos en la rizosfera y de la cantidad de nutrientes disponibles. La salinidad afecta más adversamente al estado vegetativo que al reproductivo y de madurez (Abdul-Kadir, 1982).

La salinidad produce síntomas visuales en las plantas, en ocasiones semejantes a la deficiencia de fósforo (Hewitt, 1963) como son, la prolongación de la dormancia de las yemas laterales y la reducción de la floración. También se ha descrito que contribuye a mejorar la calidad de algunas frutas (Ho *et al.*, 1986) al incrementar la concentración de hexosas y almidón durante el desarrollo del fruto (Mitchelle *et al.*, 1991a,b). Otros datos

apuntan a la alteración de la concentración de fósforo intracelular cuando las plantas de altramuz crecen con 50 mM de NaCl (Treeby y Stevenick, 1988) o a una disminución de ATP como describe Maas y Nieman (1979), Peterson *et al.* (1987) y Nieman *et al.* (1988) y Wilson *et al.*, 1992, en plantas de judía. En general se ha descrito que la salinidad afecta la sensibilidad al fósforo en los cultivos de soja (Grattan y Maas, 1988). Otro macronutriente que interfiere con la salinidad o con elevadas concentraciones de sodio en el suelo es el potasio, aún cuando ambos cationes penetran de forma independiente (Lazof y Cheeseman, 1988), se requieren elevados niveles citoplasmáticos de potasio para sobrevivir en hábitats salinos (Chow *et al.*, 1990).

Uno de los efectos más estudiados de la salinidad, es la disminución de la capacidad fotosintética de las plantas (Sing *et al.*, 1990). Esta disminución es parcialmente debida a la reducción de la conductancia estomática (Seeman y Critchley, 1985; Brugnoli y Lanteri, 1991) y a la consecuente restricción de la disponibilidad de dióxido de carbono para la carboxilación. La disminución de la fotosíntesis puede relacionarse con una reducción de la eficacia de la ribulosa bifosfato carboxilasa (Seeman y Sharkey, 1986) y con la sensibilización del FSII por el NaCl (Ball y Anderson, 1986), incluso se ha observado un descenso de la concentración de clorofila a y b (Tewari y Singh, 1991). La salinización también altera el valor de  $\delta^{13}\text{C}$ , cambio que está cuantitativamente de acuerdo con el que predice la teoría que relaciona la discriminación isotópica con la contribución intracelular de dióxido de carbono (Farquhar *et al.*, 1982; 1989).

También se ha observado que la salinidad en el suelo modifica diversas actividades enzimáticas, concretamente afecta negativamente la formación de semillas (Dubey y Rany, 1987; 1989), puesto que el nivel de diversos metabolitos se modifican debido a la alteración inducida por la sal de la actividad de distintas enzimas (Dubey, 1985). En semillas con diferente sensibilidad a la sal se muestran diferentes comportamientos de amilasas, nucleasas, proteasas, fosfatasas (Dubey y Sharma, 1990), peptidasas (Mikkonen, 1986) y peroxidadas (Mittal y Dubey, 1991). El estrés salino también causa una intensa actividad proteolítica en plantas, siendo mayor en raíces que en tallos. De hecho, Dubey y Rani (1990) contrastaron que la tolerancia a la sal se asocia con una elevada actividad de proteasas, aminopeptidasas y una baja actividad carboxipeptidasa. Además, en plantas resistentes o halófilas se inducen una serie de proteínas de elevado peso molecular como mecanismo de adaptación a condiciones hipersalinas, estas proteínas no se inducen en leguminosas sensibles como *Phaseolus vulgaris* (Billard *et al.*, 1982). De igual manera se expresan Mittal y Duney (1991) cuando indican que ante el estrés salino los cultivos tolerantes responden disminuyendo la actividad peroxidasa en el endospermo, raíz y tallo, mientras que los cultivos sensibles a la sal se asocian con un incremento de la actividad del enzima en los mismos

órganos así como de los isoenzimas.

Otro efecto de la salinidad en las plantas consiste en modificar el transporte de fotoasimilados por el floema y el flujo de iones por el xilema. Se ha descrito que la reducción de nitratos en la raíz se inhibe por la sal lo que aumentó el transporte de nitratos en el xilema. Pate (1973) observó que la reducción de nitratos en la raíz constituye sólo un 65% en presencia de NaCl frente al 94% del control. El contenido de otros cationes como el  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  y aniones como el  $Cl^-$  se vió modificado (Jeschke *et al.* 1992) por el estrés salino. El fósforo puede tener un papel en el ajuste osmótico debido al incremento de la absorción y distribución de este elemento observado en plantas sometidas a estrés salino (Treeby *et al.*, 1988 a,b).

Se ha asumido que la técnica de cultivo de tejidos puede ser utilizada para descifrar los mecanismos de tolerancia a la sal por las plantas (Rains, 1986) y para desarrollar plantones o embriones tolerantes a la sal (Galiba y Yamade, 1988). Los mecanismos de tolerancia son diversos, alguno de ellos relacionados con la exclusión de iones sodio y tolerancia de los cloruros (Unnikrishnan *et al.*, 1991). Sin embargo, la exclusión o acumulación de iones esta muy condicionada por los fenotipos y los cultivares (Galiba *et al.*, 1989). Tirech *et al.* (1991) sugiere que el cultivo de células puede responder a las condiciones de estrés salino dependiendo del fenotipo. Recientemente Dracup (1991) realiza una revisión sobre el tema, concluyendo que la obtención de cultivos de células tolerantes a la sal tienden a no ser expresado en la regeneración de plantas, aduciendo razones justificadas.

## 5.2. Efectos producidos en los nódulos por la salinidad

Bernstein y Hayward (1958) y Niemann (1962) han descrito el grado de tolerancia a la sal de numerosos cultivos encontrándose las leguminosas entre las más sensibles. La remolacha y la espinaca se encuentran entre las más tolerantes, mientras que, la cebolla y guisante son las más sensibles. Las judías muestran una ligera tolerancia cuando los niveles de sal son intermedios (Garrido, 1992), pero con 100 mM de NaCl se reduce un 85% su crecimiento (Wignarajah, 1990) en cambio *Lupinus* sp se consideran plantas de respuesta halofítica al estrés salino medio (Van Steveninck *et al.*, 1982).

La sal puede influir en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa afectando el crecimiento y supervivencia del *Rhizobium* en el suelo, restringiendo de esta manera la colonización radical (Zahran y Sprent, 1986), así como, el proceso de infección (Singleton y Bohlool, 1984), el desarrollo del nódulo (Craig *et al.*, 1991), el número y peso de nódulos por planta (Hafeez *et al.*, 1988), el funcionamiento del nódulo (Hopmans *et al.* 1984) y por último,

reduciendo la actividad nitrogenasa (Wilson, 1985).

Esta inhibición de la formación del nódulo y la fijación de nitrógeno por la sal ha sido descrita en *Glycine max* (Singleton y Bohlood, 1984), en *Glycine wightii* (Wilson, 1970), en *Trifolium alexandrinum* (Bajpai y Gupta, 1979), en *Medicago sativa* (Subba Rao *et al.*, 1972; Bekky *et al.*, 1987), en *T. subteraneum* (Hopmans *et al.*, 1984), en *Vicia faba* (Youssef y Sprent, 1983; Zahran y Sprent, 1986), en *Vigna radiata* (Hafeez *et al.*, 1988), en *Cicer arietinum* L. (Elsheikh y Wood, 1990) y en *Glycine max* (Singleton y Bohlood, 1984), así como en no-leguminosas *Casuarina equisetifolia* (Ng, 1987).

Numerosas investigaciones han informado que la tolerancia a la salinidad de *Rhizobium* es mayor que la de la leguminosa (Wilson, 1970; Bhardwaj, 1975; Kassem *et al.*, 1985). Las bacterias pueden adaptarse al incremento de niveles de NaCl incrementando sus niveles intracelulares de potasio o glutamato (Yelton *et al.*, 1983), de aminoácidos acíclicos (Brown, 1976) o prolina (Csonka, 1989). En un estudio llevado a cabo con *Vigna radiata* se comprueba que aunque la sal reduce un 75% el peso del nódulo, la reducción de la actividad nitrogenasa no es tan drástica, lo que indica que aún cuando la salinidad afecta a la formación del nódulo, cuando éste está formado, la sal influye débilmente en su funcionamiento, entonces la planta puede disponer de fotoasimilados que contribuyen a su funcionamiento (Hafeez *et al.*, 1988). Por lo que se ha sugerido, que el efecto del NaCl en la nodulación puede ser un efecto indirecto a través de la planta huésped. Sin embargo, hay evidencias que indican que la salinidad afecta más a la nodulación que a la planta huésped, entre las que se pueden citar: a) El efecto de la salinidad en el contenido en nitrógeno de la planta fue más pronunciado en plantas fijadoras de nitrógeno que en plantas fertilizadas con nitratos (Youssef y Sprent, 1983; Alston y Graham, 1982; Pate y Dart, 1961) b) El crecimiento de las plantas a expensas de la fijación simbiótica de nitrógeno se afectó más intensamente por la sal que cuando crecían con nitrógeno combinado (Lauter *et al.*, 1981) c) En experimentos con raíces divididas de soja el efecto de la salinidad se observó en la nodulación y no en la parte aérea (Singleton y Bohlood, 1984). Cuando se inoculan cultivos de *Cicer arietinum* con cepas de *Rhizobium* resistentes a la sal que producen una simbiosis efectiva bajo condiciones salinas Elsheikh y Wood (1990) concluyen que la fijación de nitrógeno fue más sensible a la sal que cuando crece la planta no nodulada.

La identificación de solutos intracelulares y su modificación en condiciones de estrés salino puede usarse en potencia en la selección de cultivares adaptados a la sal. La información a nivel celular de los metabolitos del nódulo y especialmente en bacteroides (Bekki *et al.*, 1987) es esencial para entender el mecanismo involucrado en la inhibición de la fijación de nitrógeno por la sal. El estrés salino también disminuye la concentración de

ácidos orgánicos, alrededor del 40%, tanto en nódulos como en raíces de alfalfa (Fougère *et al.*, 1991). Sin embargo aumenta la concentración de ácido láctico, sobre todo en bacteroides donde llegó a ser el ácido mayoritario, contribuyendo parcialmente a restaurar el ajuste osmótico.

La producción de acetileno por bacteroides aislados de nódulos de *Medicago sativa* inoculado con estirpes de *Rizobium meliloti* tolerantes y no tolerantes a la sal, fue inhibida con distinta intensidad en presencia de NaCl en el medio de incubación (Bekki *et al.*, 1987). Estos autores sugirieron que la inhibición de la actividad reductora de acetileno por la sal podría estar directamente relacionada con la inhibición de la capacidad respiratoria de los bacteroides causada también por el estrés salino.

El pool de aminoácidos y de carbohidratos se aumentan con el estrés salino en nódulos de alfalfa (Fougère *et al.*, 1991). Respuestas similares se han detectado en nódulos de *Vicia faba* (Venekamp y Koot, 1988) y de *Glycine max* (Ford, 1984). Entre los aminoácidos, la prolina y la asparragina exhiben un incremento espectacular (Hanson y Hitz, 1982), demostrando así su implicación en la osmorregulación. Entre los carbohidratos, el estrés salino modifica considerablemente la relación pinitol/sacarosa y el ciclitol que pueden contribuir a la tolerancia al estrés salino (Fougère *et al.*, 1991).

La fijación de nitrógeno se modifica cuando a un suelo salino se le adiciona nitrógeno combinado (Pale y Dart, 1961). De hecho la efectividad de la nodulación y la eficacia de la nitrogenasa están negativamente correlacionadas con la concentración de nitrógeno inorgánico en el suelo (Alslon y Granham, 1982).

### 5.3. Metabolismo nitrogenado bajo condiciones de estrés salino

La salinidad puede alterar la absorción de algunos nutrientes del suelo como los nitratos (Aslam *et al.*, 1984) el potasio y calcio (Cramer *et al.*, 1983) y el amonio (Leide *et al.*, 1992) produciendo un desequilibrio nutricional en la planta, que se traduce en un anormal crecimiento de la planta y una alteración del metabolismo no proteico. Los efectos de la salinidad ante la presencia de amonio y nitrato en el suelo son más pronunciados con el nitrato que con el amonio (Pessarakli *et al.*, 1989b), aún cuando Leide *et al.* (1992) señala que el nitrato es mejor fuente de nitrógeno que el amonio en plantas que crecen en condiciones de estrés salino.

Generalmente se describe que el estrés salino promueve la acumulación de nitratos, amonio, aminoácidos libres en plantas (Saad, 1979). El bajo potencial osmótico en la solución nutritiva inducido por el ClNa inhibe el metabolismo del nitrato y provoca la acumulación de compuestos nitrogenados solubles (Pessarakli y Tucker, 1995). También se describe la

reducción de la proteínosíntesis, sin embargo no se ha establecido si es la reducción es el resultado de la degradación proteica (Mothes, 19??) o es debido a una alteración en la incorporación de los aminoácidos (Stewart y Lee, 1974; Wyn Jones y Storey, 1978) a las proteínas. Held *et al.* (1975) observó que el ClNa mejora la absorción de nitrógeno lábil y su incorporación a la fracción proteica (Langdale *et al.*, 1973). La presencia de cloruros puede inhibir la absorción del nitrato (Smith y Thompson, 1971), no afectar intensamente (Rao y Ruins, 1976) o depender de la variación genotípica de la especie vegetal (Bloom y Finazzo, 1986). Los informes sobre el efecto de la salinidad en la asimilación de nitrógeno son controvertidos, es evidente que las medidas de los procesos de asimilación del nitrógeno deben haberse simultaneado (Aslam *et al.*, 1984).

En leguminosas se ha estudiado el efecto que el estrés salino produce en los enzimas del metabolismo nitrogenado y de la fijación de nitrógeno (Aparicio-Tejoj *et al.*, 1984; AdbelWahab y Zahran, 1981; RandallWersz *et al.*, 1987), en el metabolismo nitrogenado radical (Becana *et al.*, 1984; Kaur *et al.*, 1985) y en la asimilación de amonio (Miranda-Ham y Loyola-Vargas, 1987; 1988).

Kozlawsky (1972) revisó en un estudio los enzimas que se alteraban en las plantas ante un estrés enfatizando en la actividad de la enzima nitrato reductasa. Heimer (1973), Bottaan *et al.* (1985) y Marline y Cerdá (1990) encontraron que la actividad de esta enzima se inhibió con el ClNa. Daines y Gould (1985) y Misra y Dwiverde (1990) detectaron que en estas condiciones el enzima se estimula, mientras que Aslam *et al.* (1984) describe que no varió la actividad. Los resultados son bastante controvertidos (Abdul-Kadir y Paulsen, 1982; Bloom-Zandstre y Lampe, 1983). Para Anslefeld (1974) el efecto de la sal en esta actividad enzimática depende de la dosis y para Pessaraki *et al.* (1989) depende del órgano estudiado, así en *Phaseolus vulgaris* los tallos son mas seriamente afectados que las raíces por la salinidad; mientras que en *Lupinus albus*, leguminosa tolerante a la sal, la reducción de nitrato en raíz fue totalmente inhibida (Jesohke *et al.*, 1992). Aslam *et al.*, (1984) observaron que la inhibición de la actividad nitrato reductasa fue mayor cuando la sal fue adicionada al medio de ensayo *in vitro* que cuando esta actividad enzimática fue determinada mediante el método *in vivo*. Esto indica que *in situ* la actividad nitrato reductasa está protegida del estrés salino. La susceptibilidad del dañarse el transportador del nitrato más que el sistema reductor de nitratos puede ser el factor crítico para la supervivencia de la planta durante el periodo de estrés. Schrader (1978) también se informó de una inhibición similar de la actividad nitrato reductasa cuando *in vitro* se adicionó amonio y cloruro sódico al medio de ensayo. Profundizando en el tema Martinez y Cerdá (1989) concluyeron que la actividad nitrato reductasa se afectó directamente por la

presencia de NaCl en el medio radical a dos niveles, interfiriendo en la absorción de nitratos e inhibiendo el transporte de nitrato de la vacuola al citosol. Este efecto se acentúa con amonio en el medio de crecimiento como fuente de nitrógeno combinado.

La actividad nitrato reductasa también se inhibe con la sal, sin embargo es menos sensible que la nitrato reductasa a este estrés. La nitrato reductasa es más sensible al ensayo *in vitro* que *in vivo* (Rao *et al.*, 1988). Al incubar la enzima con  $\text{ClNa}$  y  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  se detecta que la salinidad aniónica es más tóxica que la catiónica para la supervivencia de la planta durante el periodo de estrés (Krishana-Rao y Gnanam, 1990). Las enzimas de la asimilación del amonio también se afectan por la interacción descrita entre la sal en el medio y la fuente de nitrógeno para la planta (Bourgeois-Choillere *et al.*, 1992). Así la tolerancia a la sal está relacionada con una constante en la relación NR/NiR y GS/GOGAT (vía predominante de la asimilación de amonio en condiciones de estrés salino según Misra y Dwivedi (1990) y GS/GDH y en el contenido de nitrato. Mientras que la sensibilidad a la sal está ligada a la utilización del nitrógeno. En el caso que las plantas crezcan con amonio, la salinidad aumenta la relación GS/GOGAT, las actividades GDH y la PEPcarboxilasa, mientras que con nitratos en el medio de crecimiento, la salinidad incrementa la relación NR/NiR y la actividad PEPcarboxilasa así como los niveles de ácidos orgánicos.

#### 5.4. Respuesta fisiológica ante el estrés

La selectiva acumulación intracelular de aminoácidos como, asparragina, betaína, leucina, prolina, metionina y valina, es una respuesta fisiológica de muchos organismos al estrés osmótico (Yancey *et al.*, 1982). En plantas superiores, tal incremento se da como respuesta a la salinidad y a otros tipos de estrés como sequía y bajas temperaturas (Aspinall y Paleg, 1981; Irigoyen *et al.*, 1992).

La acumulación de prolina en respuesta al estrés salino se ha observado en halófitas (Ostrem *et al.*, 1987) y no halófitas (Aspinall y Paleg, 1981). En general, la cantidad de prolina se correlaciona con el grado de salinidad (Steward y Gorhan, 1983), ya que el incremento de prolina aumenta a las pocas horas del estrés (Tewari y Sing, 1991) y puede aumentar 10 veces si se aplica exógenamente (Treichel, 1979). Cuando cesa el estrés, la prolina desciende rápidamente (Stewart, 1972).

En términos de relaciones hídricas, la acumulación de prolina en los tejidos se relaciona con un descenso en el potencial hídrico, que se produce tanto en estrés por sequía como en estrés salino. Sin embargo, bajo estrés salino el descenso en potencial hídrico se debe, íntegramente, a un descenso en el potencial osmótico, mientras que, en estrés por



sequía se debe a un descenso del potencial de turgor y del potencial osmótico debido a que disminuye el volumen de la célula.

Varias funciones fisiológicas han sido asignadas a la síntesis de prolina inducida por el estrés: puede actuar en el ajuste osmótico (Hosegawe *et al.*, 1986), como sumidero de energía y de nitrógeno (Aspignal y Paleg, 1981), además se la ha relacionado con los procesos de senescencia (Wany *et al.*, 1982), también puede servir de índice de resistencia al estrés, sin embargo la relación entre ambos está bastante discutida (Levy, 1983), no obstante en algunos trabajos con cereales se utiliza este índice por no tener disponible ningún otro (Sing *et al.*, 1973).

Entre los precursores de la biosíntesis de prolina se pueden citar los ácidos orgánicos originados como consecuencia del estrés (Göring y Plescher, 1986; Zoglaner *et al.*, 1987). En *V. faba* Venekamp y Koot (1988) confirman estos resultados y además concluyen que la prolina puede ser sintetizada a partir del nitrato y metabolitos carbonados procedentes de sistemas respiratorios. Sin embargo, no hay duda de que el glutamato es el principal precursor (Sing *et al.*, 1973), pudiendo proceder de la asimilación del amonio via GS/GOGAT (Klaus *et al.*, 1986). Yamaya *et al.* (1986) en condiciones de estrés, cuestionan que esta sea la vía de síntesis de glutamato como precursor de la prolina y proponen a la glutamina deshidrogenasa como enzima que relaciona los procesos de respiración oxidativa y la biosíntesis de prolina. En este sentido, Davis (1986) describe un estímulo de las actividades deshidrogenasas como respuesta a la alteración de pH producida por el incremento en ácidos orgánicos bajo condiciones de estrés.

El metabolismo biosintético de la prolina parece ser idéntico en todos los organismos. La mayor parte de las enzimas catabólicas y biosintéticas han sido estudiados en de microorganismos. La biosíntesis de la prolina se inicia con dos reducciones y una ciclación a partir del ácido glutámico. Las enzimas que intervienen en primer lugar forman un complejo enzimático denominado P-5C-sintasa en donde colaboran dos enzimas, la  $\gamma$ glutamil-quinasa y la  $\gamma$ glutamil-fosfato-reductasa; este complejo produce un intermediario inestable que rápidamente se transforma en GSA (semialdehidoglutámico) que se cicla de forma espontánea por una reacción no enzimática (Beich y Pienan, 1965; Baich, 1971; Smith *et al.*, 1981) para formar el metabolito clave de la ruta, el ácido 5-pirolidil carboxílico (P5C).

La reducción de P5C a prolina se realiza mediante la P5C-reductasa (P5CR), enzima localizada en el citosol vegetal que cataliza una reducción dependiente del NAD(P)H. La actividad de esta enzima es bastante elevada en nódulos de soja (Kohl *et al.*, 1988). Su Km para el NADPH es 25 veces inferior a la que se detectó para el NADH. La actividad se inhibe en presencia de NADP<sup>+</sup> pero no se inhibe con la prolina; esta inhibición se cesa por

el estrés.

Al producirse la biosíntesis de prolina se obtiene un incremento en la disponibilidad de NADP<sup>+</sup> como consecuencia de la reducción del P5C lo que podría estimular la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Krebs y Egglenton, 1974). Evidentemente, conllevaría un incremento en la producción de ribulosa 5 fosfato que conectaría con intermediarios de la biosíntesis de ribonucleótidos purínicos. Yen y Phang (1988) demostraron que el P5C incrementa la síntesis de ribulosa 5-fosfato y subsecuentemente del fosforibosilpirofosfato (PRPP). Asimismo, otras vías metabólicas se conectan por el complejo P-5C-sintasa (Matsuzawa y Ishiguo, 1980; Brandiss y Falrey, 1992).

Kohl *et al.* (1988) consideran que la prolina tienen un papel en la fijación de nitrógeno, al considerarlo como esqueleto carbonado reducido que podría ser oxidado y contribuir como fuente de energía en el bacteroide del nódulo. Sin embargo esto fue cuestionado por Day *et al.* (1990) cuando detectó que la prolina no es absorbida rápidamente por el bacteroide. Se sugirió que la membrana peribacteroidea carece de transportador de prolina y que la entrada de la prolina tendría que ser por difusión pasiva. Zhu *et al.* (1992), en experimentos con nódulos de soja "in vivo" encuentra que el flujo de la prolina por la membrana peribacteroidea es más lento que el de malato y el de succinato pero lo suficientemente rápida para influir en eventos metabólicos de interés. Es interesante señalar que la prolina exógena estimula la actividad reductora del acetileno en nódulos intactos de soja de forma similar al succinato y glutamato (Zhu *et al.*, 1992). Otra línea que evidencia su la conexión de la prolina con la fijación de nitrógeno este relacionada con el estudio del operón *ntr* (nitrógeno regulador) que regula la expresión de tres genes, el *gln A* (gen estructural de la glutamina sintetasa, el *nif* (fijación de nitrógeno) y el *put* (utilización de prolina) (Magasasnik, 1982).

La prolina sintetizada en el citosol vegetal es catabolizada en el bacteroide por la prolina deshidrogenasa. La actividad de la prolina deshidrogenasa (ProDH) se detecta prioritariamente en los bacteroides de nódulos, solo un 2% de la actividad total se detecta en plastidios y mitocondrias (Stewart, 1981). Este enzima es la que debe suministrar parte de la energía necesaria para la fijación de N<sub>2</sub> y aumenta entre 2 y 4 veces cuando los bacteroides se someten a un estrés (Kohl *et al.*, 1991). La compartimentación de la ProDH en los nódulos proporciona la posibilidad de que la P5CR y la ProDH juegue un papel en la transferencia del potencial redox entre el citoplasma y el bacteroide.

## 6. PERSPECTIVAS

La propuesta que sugiere Epstein y Norlyn (1977) para superar la salinidad se basa en la "selección y manipulación" para la tolerancia a la sal, una propuesta eficiente e económica. Hay diferentes estrategias que han adaptado varios investigadores para superar la salinidad (Ashraf y McNeilly, 1987). Una de ellas es el screening del germoplasma autóctono de un cultivo con objeto de identificar el cultivar más tolerante, como es el caso de *Lens culinaris* M. (Ashraf y Wareed, 1990). Pacovsky y Fuller (1991) proponen que en un programa de mejora de la fijación de nitrógeno en *Phaseolus*, se debe identificar en el germoplasma que expresa elevados niveles de GS o NADH-GOGAT específica de nódulos y este material debería usarse con cepas efectivas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* que previamente hayan sido seleccionadas para dar lugar a una asociación simbiótica óptima. Se han descrito otros métodos directos de selección y manipulación para mejoramiento de cultivos tolerantes a la sal sin considerar los mecanismos que inducen esta tolerancia (Epstein, 1985; Shannon, 1985). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos son cruciales en una búsqueda rápida y para conocer los distintos parámetros objetivos que pueden favorecer un programa de screening (Yeo y Fowers, 1984). Entre las estrategias que adoptan las plantas adaptadas a la salinidad está la intrusión o extrusión iónica en vacuola/citoplasma (Binzel *et al.*, 1988) y el incremento del nivel de solutos compatibles (Stewart y Lee, 1979; Handa *et al.*, 1986).

Sin embargo, al considerar a las leguminosas han de contemplarse como asociación simbiótica en la que la sal afecta tanto a la planta como a la bacteria y por tanto al nódulo fijador de nitrógeno. Conocer cual de los dos componentes de la simbiosis actúa como factor determinante del estrés salino es interesante, sin duda los esfuerzos actuales están encaminados en que la tolerancia a la sal debe centrarse en la planta y no en el *Rhizobium*, no obstante intentamos abordar simultáneamente el estudio de la sal en ambos componentes de la simbiosis.

## **Material y Métodos**

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. Material vegetal

La especie vegetal elegida para este estudio ha sido *Vicia faba* L., leguminosa grano de elevado interés agrícola en la región mediterránea. Se ha utilizado el cultivar comercial Alborea (Semillas Pacífico S.A., Sevilla) y varias líneas puras (Tabla 1) seleccionadas por el Dr. Don Antonio Martín (Dpto. de Mejora Genética, CSIC, Córdoba).

Otras especies de leguminosas, como *Vicia sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Glicine max* (Merr.), se han ensayado en el estudio comparativo de propiedades inmunológicas de la glutamato sintasa, NADH dependiente, de los nódulos de *V. faba*.

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

Denominación	Floración (días)	Color ala	Color semilla	Color hilo	Origen <sup>(a)</sup>	Variedad botánica <sup>(b)</sup>
VF4	36-37	Blanco	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF6	48-49	Negro	Marrón	Negro	Córdoba	2
VF15	30		Hueso	Blanco	Córdoba	2
VF16	29	Negro	Negro	Negro	Córdoba	2
VF17	45	Negro	Burdeos	Blanco	Córdoba	3-4
VF27	42	Negro	Negro	Negro	Córdoba	3-4
VF38	27	Morado	Hueso	Negro	Córdoba	2
VF46	39-40	Negro	Rojo-marrón	Negro	S.A.	1
VF47	55	Negro	Marrón verdoso	Blanco	Córdoba	1
VF60	43-44	Negro	Morado	Blanco	Córdoba	2
VF61	54	Negro	Negro	Negro	Córdoba	2
VF64	31	Negro	Marrón-verde	Blanco	Córdoba	2
VF83	47	Blanco	Marrón-hueso	Negro	Córdoba	2
VF112	27	Blanco			Córdoba	2
ALBOREA	40-41	Negro	Hueso	Negro	Comercial	3

(a) Origen: Córdoba, obtenidas en el Departamento de Mejora Genética, CSIC, Córdoba; S.A., América del Sur.

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

### 1.2. Microorganismos

Las habas son infectadas por *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y para este estudio se han utilizado distintas cepas silvestres (Tabla 2) aisladas de nódulos radicales de *V. faba* en nuestro laboratorio por Hervás (1991). Como control o referencia, se ha utilizado la cepa 300 (Brewin *et al.*, 1980).

Otros microorganismos utilizados han sido: *Rhizobium leguminosarum* biovar.

*phaseoli*, cepa GR12; *Rhizobium meliloti*, cepa GR4B; *Bradyrhizobium japonicum*, cepa USDA 110; *Bradyrhizobium* sp.

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

Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia	Cepa	Procedencia
GRA19	Alhama	GRI7	Iznalloz	GRL8	Loja
GRC20	Cubillas	GRI24	Iznalloz	GRL19	Loja
GRC37	Cubillas	GRI32	Iznalloz	GRL22	Loja
				GRLM40	La Malaha

### 1.3. Material animal

Se han utilizado conejos machos de la raza híbrida Nueva Zelanda-California, suministrados por Panlab (España), para la obtención del suero anti-NADH glutamato sintasa de nódulos de *Vicia faba*.

Los conejos se mantuvieron en el animalario de la Universidad de Málaga. Su alimentación se realizó con pienso compuesto de la casa Panlab, dieta 112.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1. Solución nutritiva para plantas

Para el cultivo de plantas se ha utilizado la solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), cuya composición es la que sigue:

• Macronutrientes:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.200 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.200 g
KCl .....	0.200 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.120 g
$\text{Na}_2\text{FeEDTA}$ (Secuestrene) .....	0.025 g

• Micronutrientes:

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.004 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.002 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.002 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.003 g

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0.018 g
CoCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	0.12 mg
· Agua .....	1000 ml

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

## 2.2. Medios de cultivo utilizados para la conservación bacteriana y para la preparación de inóculos.

Los medios de cultivo bacteriano fueron distribuidos en tubos Roux inclinados en pico de flauta. En ellos se conservaron las cepas de uso rutinario manteniéndose a 4°C y resemebrándose cada 2 ó 3 meses. Para evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento, se guardaron a -20°C adicionados de glicerol al 50% (v/v).

### 2.2.1. Medio 79 de Allen (Allen, 1957).

Se ha utilizado para el crecimiento de las cepas de *Rhizobium*. Su composición es la siguiente:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.6 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.2 g
CaCO <sub>3</sub> .....	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....	0.2 g
NaCl .....	0.2 g
Manitol .....	7.6 g
Glucosa .....	2.4 g
Extracto de levadura .....	0.5 g
Agar .....	15.0 g
Agua destilada .....	1000 ml

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

### 2.2.2. Medio YEM.

Utilizado para el crecimiento de *Bradyrhizobium* y cuya composición se detalla a continuación:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	2.0 g

NaCl .....	0.1 g
Manitol .....	10.0 g
Extracto de levadura .....	1.0 g
Agar .....	15.0 g
Agua destilada .....	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0-7.2 y se esteriliza a 117°C durante 20 min.

### 2.3. Medio bacteriano para curvas de crecimiento.

Para seguir el crecimiento bacteriano en el tiempo se utilizó el medio líquido YMT que no presenta ninguna turbidez, siendo su composición la siguiente:

Tryptona .....	5.0 g
Extracto de levadura .....	2.5 g
Manitol .....	10.0 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O .....	0.6 g
Agua destilada .....	1000 ml

Cuando se utilizó en forma sólida se le adicionó agar al 1.5%.

## 3. CRECIMIENTO BACTERIANO

### 3.1. Crecimiento de inóculos

El crecimiento en medio sólido de las bacterias sembradas con asa de platino e incubadas a 28°C, se mantuvo durante 72h para *Rhizobium* y de 5 a 7 días para *Bradyrhizobium*.

### 3.2. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de *R. leguminosarum*

El cultivo se desarrolló a 28°C, en agitación, en tubos de ensayo (3 tubos/tratamiento) que contenían 10 ml de medio YMT, inoculados al 4% a partir de preinóculos crecidos durante 48h. El estudio del efecto de la sal en el crecimiento bacteriano se realizó añadiendo NaCl a determinadas concentraciones en el medio de cultivo.



### 3.2.1. Crecimiento de *R. leguminosarum* GRA19 con diferentes concentraciones de NaCl en el medio

La cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, infectiva y muy efectiva, se eligió para estudiar el crecimiento de *R. leguminosarum* con distintos niveles de NaCl.

Se ensayaron cuatro niveles, 0, 50, 75 y 100 mM de NaCl. La medida del crecimiento se realizó a las 6, 12, 24, 48 y 72 h, determinándose la densidad óptica de los cultivos a 620 nm en un espectrofotómetro Spectronic (20D). Simultáneamente, se retiraron alícuotas de cada tubo para la determinación del número de células viables. Esto se hizo por diluciones decimales, depositándose 0.1 ml de cultivo en placas de Petri (3 placas/dilución) sobre las que se vertieron 15 ml de medio YMT sólido mantenido en sobrefusión a 45 °C. Para lograr una distribución homogénea de las colonias presentes en la muestra de partida es conveniente mezclar bien una vez vertido el medio en la placa. Tras el recuento de las colonias aparecidas, se calculó el valor medio de las diluciones que permitieron el recuento (Vincent, 1970).

Se determinó el tiempo de generación ( $G$ ) para describir la fase logarítmica de crecimiento, en función del número de células viables/ml. El tiempo de generación se define como el tiempo necesario en duplicar la población. La fórmula utilizada es la que sigue:

$$G = \frac{t \cdot \log 2}{\log b - \log a}$$

donde,

- $t$  = tiempo en horas transcurrido desde el inicio hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento
- $2$  = representa la multiplicación por escisión de las bacterias
- $b$  = número de células viables/ml al final de la fase logarítmica
- $a$  = número de células viables /ml al inicio de la fase logarítmica

### 3.2.2. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de *R. leguminosarum*

Para el crecimiento de las distintas cepas (Tabla 2) en condiciones salinas, se realizó adicionando al medio de cultivo NaCl hasta una concentración final de 75 mM, manteniendo un control sin NaCl de cada una de ellas. Las medidas de crecimiento se realizaron a las 6, 18, 36 y 48 h, determinándose la D.O. del cultivo a 620 nm.

## 4. CULTIVO DE PLANTAS

### 4.1. Cultivo hidropónico

Se ha llevado a cabo en jarras Leonard (Leonard, 1943) de 1.5 l de capacidad, con vermiculita como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. Las jarras Leonard constan de 2 partes de vidrio que encajan perfectamente. La parte superior contiene el sustrato y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel de celulosa asciende la solución por capilaridad, manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Se esterilizan en autoclave a 120°C durante 1 h.

### 4.2. Esterilización y germinación de las semillas

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

### 4.3. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de cultivos frescos (72 h) en medio sólido y se le adicionó solución nutritiva estéril para conseguir, por agitación mecánica, una suspensión bacteriana de  $\sim 10^9$  células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>.

### 4.4. Siembra e inoculación

En cada jarra Leonard estéril se siembran, en condiciones axénicas, dos semillas pregerminadas (1-3 cm de radícula) cubriéndose cada una de ellas con 1 ml de inóculo. Ya inoculadas se cubren con vermiculita y a continuación por una capa de perlita estéril que disminuye el riesgo de contaminación evitando a la vez las pérdidas de agua por evaporación. Antes de trasladar las jarras Leonard a la cámara de cultivo se cubren con papel, para que la luz no llegue al sistema radical.

#### 4.5. Condiciones de la cámara de cultivo

Las plantas crecieron en una cámara Koxka (SA8/17-27/R) con las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperiodo: 16h luz/ 8h oscuridad
- Temperatura:  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  día/  $17 \pm 1^\circ\text{C}$  noche
- Humedad relativa: 55% día/ 75% noche
- Intensidad luminosa:  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en la superficie de las macetas, suministrada por fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW- VHO) y lámparas incandescentes de 60 watos (30% del total de watos).

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

#### 5. EXPERIMENTOS REALIZADOS EN PLANTAS

El estudio que, sobre el metabolismo del amonio en la simbiosis *R. leguminosarum-V. faba*, presentamos se estructuró en tres bloques de experimentos sin que ello determinara una secuencia cronológica obligada sino que esta seguiría el desarrollo del propio trabajo:

- Caracterización del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*.
  - “ Desarrollo ontogénico de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*
  - “ Evolución, en el fotoperiodo, del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos fijadores de dinitrógeno de *V. faba*
- Efecto del estrés salino (NaCl) en la simbiosis de *V. faba*
  - “ Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación
  - “ Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijando dinitrógeno
  - “ Tolerancia al estrés salino en *V. faba*: utilización de líneas puras
  - “ Interacción de la fertilización nitrogenada ( ) y la sal en la simbiosis *R. Leguminosarum-V. faba*
- Estudio de la glutamato sintasa-NADH dependiente de la fracción vegetal de los nódulos de *V. faba*: caracterización y propiedades antigénicas

### 5.1. Desarrollo ontogénico de la actividad nitrogenasa y de las actividades del ciclo de la glutamato sintasa en nódulos de *V. faba*

Este estudio permitió conocer el comportamiento de los distintos enzimas a lo largo del crecimiento y desarrollo de la planta.

Se utilizó el cv. comercial Alborea de *V. faba* inoculado con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* biovar. *viciae*. Las plantas crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva adicionada de 2 mM de KNO<sub>3</sub>, concentración descrita como no inhibidora de la nodulación (Streeter, 1988). Se realizaron recogidas cada 3 ó 4 días entre los 10 y 50 días de crecimiento (13 muestreos). En cada recogida se utilizaron 3 jarras (6 plantas). El experimento se realizó dos veces.

Los parámetros determinados fueron los siguientes:

a) Crecimiento y nodulación:

- Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea

b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:

- Actividad reductora de acetileno
- Producción de hidrógeno en aire

c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:

- Actividad glutamina sintetasa
- Actividad NADH-glutamato sintasa
- NADH-glutamto deshidrogenasa

d) Determinaciones analíticas:

- Proteína soluble en nódulos
- Contenido en nitrógeno reducido en el material vegetal

### 5.2. Evolución en el fotoperiodo del ciclo de la glutamato sintasa de nódulos fijadores de dinitrógeno de *V. faba*

Se estudió la evolución de las actividades enzimáticas durante dos ciclos consecutivos de fotoperiodo (48 h) a intervalos de 3 h. Se usaron plantas de 23, momento en que la actividad nitrogenasa se encuentra estabilizada y la actividad NADH-GOGAT y GS se encuentran en su punto máximo. En cada recogida se usaron 3 jarras (6 plantas). El experimento se realizó 2 veces.

Se utilizaron plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* que crecieron con 2 mM de nitrato en la solución nutritiva.

Las determinaciones realizadas fueron las siguientes:

- a) Actividad nitrogenasa de los nódulos: Reducción de acetileno
- b) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad glutamina sintetasa
  - NADH-glutamato sintasa
  - NADH-glutamato deshidrogenasa
- c) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos

### 5.3. Efecto del NaCl aplicado en el momento de la inoculación

La aplicación del NaCl desde el inicio del cultivo nos permitió estudiar cómo se afecta el proceso de formación de los nódulos y la fijación de  $N_2$  así como las consecuencias en el crecimiento y desarrollo de la planta, todo ello desde un aspecto puramente fisiológico.

Se utilizó el cultivar comercial Alborea de *V. faba* inoculado con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Se ensayaron cuatro niveles de NaCl, 0 (control), 50, 75 y 100 mM que se adicionaron a la solución nutritiva suplementada con 2 mM de  $KNO_3$ . Se prepararon 6 jarras (12 plantas) por tratamiento realizándose recogidas a los 28 y 38 días después de la siembra. El experimento se realizó dos veces, llevándose a cabo las determinaciones que siguen:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos raíz y parte aérea
  - Número de nódulos
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad glutamina sintetasa
  - Actividad NADH-glutamato sintasa
- b) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos

### 5.4. Efecto del NaCl aplicado a simbiosis establecidas y fijando dinitrógeno

Con este experimento se pretendió estudiar el mínimo nivel de NaCl que afecta el crecimiento de *V. faba* cuando los nódulos son fijadores.

Las plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* crecieron con solución nutritiva adicionada de 2 mM de  $\text{KNO}_3$  hasta los 28 días, momento en que se aplicaron 3 niveles de NaCl, estableciéndose un diseño experimental de 4 tratamientos, 0, 50, 75 y 100 mM, con 9 repeticiones por tratamiento para utilizar 3 de ellas en cada una de las 3 recogidas, realizadas a los 7, 14 y 21 días después de la aplicación del NaCl. Además, se llevó a cabo una recogida en el día 0, momento de aplicación de la sal. Los datos son media de dos experimentos. Las determinaciones realizadas fueron las que siguen:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad glutamina sintetasa
  - Actividad NADH-glutamato sintasa
- d) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos
  - Contenido de nitrógeno reducido en el material vegetal

#### 5.5. Tolerancia al estrés salino en *V. faba*: utilización de líneas puras

Este screening se realizó para buscar la posible resistencia natural a la sal entre las líneas puras de que disponíamos.

Se utilizaron 16 líneas puras de *V. faba* que crecieron a 75 mM de NaCl desde el inicio del cultivo, considerada como un nivel medio-alta (experimentos anteriores). La recogida de plantas se llevó a cabo en floración, que aconteció en diferente tiempo relativo según las líneas (Tabla 1).

Los parámetros determinados fueron los siguientes:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación de amonio en nódulos:
  - Actividad glutamina sintetasa

- Actividad NADH-glutamato sintasa
- c) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos
  - Contenido de nitrógeno reducido en el material vegetal

### 5.6. Interacción de la fertilización nitrogenada y la sal en la simbiosis *R. leguminosarum-V. faba*

La interacción de la fertilización nitrogenada y la sal en plantas inoculadas de *V. faba* se ha estudiado con la combinación de dos niveles de NO (2 y 8 mM) y cuatro concentraciones de NaCl (0, 50, 75 y 100 mM).

El NO se aplicó desde el inicio del cultivo y el NaCl se adicionó al medio de cultivo tras 18 días de crecimiento, en dosis sucesivas hasta el día 24 en que se alcanza la concentración final (Wignarajah, 1990). A partir de este momento se realizaron 4 recogidas a intervalos de 3 días. El experimento se realizó dos veces y los parámetros determinados fueron:

- a) Crecimiento y nodulación:
  - Peso seco y fresco de nódulos, raíz y parte aérea
- b) Actividad nitrogenasa de los nódulos:
  - Actividad reductora de acetileno
  - Producción de hidrógeno en aire
- c) Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos:
  - Actividad glutamina sintetasa
  - Actividad NADH-glutamato sintasa
- d) Determinaciones analíticas:
  - Proteína soluble en nódulos
  - Contenido de nitrógeno reducido en el material vegetal
  - Contenido en prolina soluble

## 6. METODOLOGÍA EMPLEADA

### 6.1. Análisis del crecimiento: parámetros

En el momento de la recogida se procedió a sacar las plantas de las jarras Leonard y a lavar las raíces abundantemente con agua para eliminar los restos de vermiculita. Posteriormente, se lavaron con agua destilada, secando el exceso con papel de filtro. Los

nódulos de cada planta se aislaron, registrando inmediatamente el peso fresco y el número cuando procedió. A continuación, se mezclaron de modo uniforme por tratamiento y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

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

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

Dado que los diferentes genotipos florecen a distintos tiempos y por consiguiente su período de cultivo difiere de unos a otros, se calculó a efectos comparativos una tasa de crecimiento absoluto, dividiendo el peso seco de la planta por el número de días de cultivo, expresándose en  $\text{mg PS} \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . También se ha calculado una tasa de crecimiento relativo (TCR) que nos permitió estudiar la velocidad de crecimiento cortos intervalos de tiempo a lo largo del período de cultivo, se expresa en  $\text{mg PS} \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , usando la fórmula descrita por Hunt (1982):

$$\text{TCR} = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1}$$

donde,

$W_2$  = peso seco de la planta en la última recogida

$W_1$  = peso seco de la planta en la penúltima recogida

$t_2$  = día en que se realizó la última recogida

$t_1$  = día en que realizó la penúltima recogida

## 6.2. Actividades de la nitrogenasa

La producción de hidrógeno y la reducción de acetileno por la nitrogenasa (EC 1.7.99.2) se determinó en muestras de raíz (2 g) constituidas por fragmentos de 2 a 4 cm con nódulos adheridos (0.2-0.4 g de peso fresco) (Herdina y Silsbury, 1990a). Tanto la producción de hidrógeno como la reducción de acetileno se midieron secuencialmente sobre la misma muestra.



### 6.2.1. Producción de hidrógeno por la nitrogenasa

La producción de hidrógeno concomitante con la reducción de nitrógeno por la nitrogenasa fue medida utilizando cromatografía gaseosa (Schubert y Evans, 1976; Bédmar *et al.*, 1983) según la metodología descrita por Caba (1991). Se tomaron muestras de 1 ml de la atmósfera que rodea a la raíz tras 20 min de incubación. Se realizaron 6 repeticiones y la producción de hidrógeno se expresó en  $\mu\text{mol H}_2 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 6.2.2. Actividad reductora de acetileno

El flujo total de electrones a través de la nitrogenasa fue evaluado por el test de reducción de acetileno mediante cromatografía gaseosa (Burris, 1972), según la metodología descrita por Hervás (1988). Tras la adición de acetileno se tomaron muestras a los 10 y 20 min de la atmósfera que rodea a la raíz para cuantificar el etileno producido y la actividad se expresó en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 6.2.3. Cálculo de la eficiencia relativa

La eficiencia relativa (ER) de los nódulos se calculó a partir de los datos obtenidos en los apartados 6.2.1.1 y 6.2.1.2, según la ecuación propuesta por Shubert y Evans (1976):

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

## 6.3. Enzimas de la asimilación del amonio en nódulos

### 6.2.2.1. Preparación de extractos libres de células

Para la extracción de estas enzimas se utilizó la metodología propuesta por Groat y Vance (1981), optimizada en nuestro laboratorio (Caba *et al.*, 1991). El medio de extracción consistió en tampón maleico-KOH 100 mM pH 6.8, adicionado de sacarosa 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v) y etilenglicol 15% (v/v), como estabilizantes de los enzimas. Los nódulos se homogeneizaron en mortero con medio de extracción en proporción 1/6 (p/v) y polivinilpirrolidona (PVPP) insoluble en una cantidad equivalente al 50% del peso fresco de la muestra vegetal. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa, a continuación se clarificó por centrifugación, a 2500 g durante 5 min para eliminar restos de tejido y células, y posteriormente a 30000 g durante 20 min, en una centrifuga Sorvall Superspeed RC-5B (DuPont Instruments) a 4°C. Se obtiene así una solución nítida con las proteínas

solubles del citosol del nódulo, que se empleó como fuente de los enzimas. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo en baño de hielo picado a una temperatura de 0 y 4°C.

Las tres actividades se ensayaron dentro de las 3 h siguientes a la extracción, siguiendo las recomendaciones de Farnden y Robertson (1980) y Groat y Vance (1981). No obstante, la glutamato sintasa, la más inestable, siempre se ensayó inmediatamente después de la extracción en un período no superior a una hora y media.

#### 6.2.2.2. Valoración de la actividad glutamina sintetasa

La actividad glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) de los nódulos se valoró mediante el ensayo semibiosintético, en el que uno de sus productos de reacción, el  $\gamma$ -glutamil hidroxamato ( $\gamma$ GH), puede valorarse mediante una reacción colorimétrica. El ensayo ha sido adaptado a partir de la metodología propuesta por Farnden y Robertson (1980), Kaiser y Lewis (1984) y Lillo (1984). Las mezclas de reacción contienen, en 1 ml de volumen total, tampón imidazol-HCl 0.15 M pH 7.8, Na<sub>2</sub>-EDTA 4 mM, L-glutamato sódico 0.15 M, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 45 mM, hidroxilamina 30 mM, ATP 10 mM y 0.2 ml de extracto, que inicia la reacción.

La reacción se desarrolla a 30°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se detiene por la adición de 0.5 ml de reactivo de cloruro férrico (mezcla de volúmenes iguales de: 10% (p/v) FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O en HCl 2 N; 24% (p/v) ácido tricloroacético en agua destilada y 50% (v/v) HCl en agua destilada), agitando vigorosamente. Las mezclas se centrifugan a 3500 g durante 5 min y se registró la absorbancia del sobrenadante a 540 nm.

De cada extracto se prepararon 4 repeticiones, un blanco (omitiendo el glutámico y la hidroxilamina) y dos controles a tiempo cero (deteniendo la reacción inmediatamente antes de la incubación).

La cuantificación del  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado se hace a partir de una recta de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de hidroxamato. La actividad se expresó en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

#### 6.2.2.3. Valoración de la actividad NADH-glutamato sintasa

La actividad NADH-GOGAT (EC 1.4.7.1) de los nódulos se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación de NADH (Groat y Vance, 1981; Singh y Srivastava, 1986). La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 ml, tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1% (v/v),  $\alpha$ -cetoglutarato 2.5 mM, aminoocetato 1 mM, NADH 0.15 mM, L-glutamina 10 mM y 0.05 ml de extracto. La reacción se inicia con la adición de la L-glutamina. La disminución de la absorbancia, lineal al menos durante 12 min después de una fase lag de la misma, fue registrada durante un período de 10 min en un espectrofotómetro Beckman DU-70 termostalizado a 30°C. Se prepararon 4

repeticiones y un blanco sin  $\alpha$ -cetoglutarato para corregir la posible oxidación endógena del NADH.

#### 6.2.2.4. Valoración de la actividad NADH-glutamato deshidrogenasa

La actividad NADH-GDH en nódulos se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADH. La mezcla de reacción de 1 ml contenía, tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1% (v/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100 mM, NADH 0.1 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 2.5 mM y 0.1 ml de extracto. La reacción se inicia con la adición del  $\alpha$ -cetoglutarato. La disminución de la absorbancia, lineal al menos durante 10 min después de una corta fase *lag* de la misma, fue registrada durante 8 min en un espectrofotómetro Bechman DU-70 termostatzado a 30°C. Se prepararon 4 repeticiones y un blanco sin  $\alpha$ -cetoglutarato para corregir la posible oxidación endógena del NADH.

#### 6.2.2.5. Cálculo de la actividades enzimáticas NADH-GOGAT y NADH-GDH

El cálculo de las actividades enzimáticas acopladas a una reacción de oxido-reducción NAD(P)H se realiza según la siguiente ecuación:

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

donde,

$\Delta \text{ D.O.} \cdot \text{min}^{-1}$  = incremento medio de D.O. por minuto

V = volumen total de la mezcla de reacción

$V_T$  = volumen total de extracto

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

d = ancho de la cubeta = 1 cm

v = volumen de extracto en la mezcla

$10^6$  = para expresar la actividad en micromoles

La actividad del enzima se expresó en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  o en  $\mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ .

### 6.3. Determinaciones analíticas

#### 6.3.1. Determinaciones realizadas en nódulos

##### 6.3.1.1. Determinación de proteína soluble

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

Se utilizaron alícuotas de 0.1 ml convenientemente diluidas para que contengan entre 2 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína, a las que se le añadió 1 ml de reactivo Bradford y tras agitar se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 min y antes de 1 h.

El cálculo de la concentración de proteínas se realizó, siguiendo el mismo procedimiento, mediante una curva patrón de seroalbúmina bovina (Merk, fracción V) en cantidades comprendidas entre 2 y 10  $\mu\text{g}$ .

##### 6.3.1.2. Determinación de prolina

La extracción se realizó en mortero utilizando como medio de extracción ácido sulfosalicílico al 3% (p/v) con una relación peso de muestra/volumen de medio de 1/10. Tras la maceración se centrifugó a 2500 g durante 10 min, el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto crudo para la determinación de prolina.

Se utilizaron alícuotas de 0.25 a 1 ml de extracto crudo, a las que se les adicionó 1 ml de ninhidrina, preparada al 2.5% (p/v) en una solución formada por ácido acético glacial al 60% (v/v) y ácido fosfórico (85%) al 40% (v/v), 1 ml de ácido acético glacial y ácido sulfosalicílico para completar hasta un volumen total de 3 ml. Esta mezcla de reacción se hierve durante 60 min, se para con hielo durante 1 ó 2 min, a continuación, se añaden de 2 a 4 ml de tolueno y se agita fuertemente, formándose dos fases, la fase superior se utilizará para medir la absorbancia a 520 nm. Se utilizó un blanco con ácido sulfosalicílico.

Para el cálculo de la concentración de prolina se preparó, siguiendo el mismo procedimiento, una curva patrón con prolina (Sigma) en cantidades comprendidas entre 0.1 y 100  $\mu\text{g}$ .

#### 6.3.2. Determinaciones realizadas en parte aérea y raíz

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

descrita por Lachica *et al.* (1965, 1973). Se realizaron las siguientes determinaciones.

#### 6.3.2.1. Determinación de nitrógeno

El nitrógeno se valoró por el método de Kjeldahl, utilizando el sistema de Bouat (Bouat y Groucet, 1965), basado en la valoración del  $\text{NH}_3$  formado al reaccionar el mineralizado con NaOH. El arrastre del vapor de amoníaco se lleva a cabo por corriente de aire, lo que permite además vaciar el contenido del matraz colector una vez finalizada la valoración de cada muestra. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular Beckman-25.

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

#### 6.3.2.2. Determinación de potasio y sodio

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

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

#### 6.3.2.3. Determinación de calcio y magnesio

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

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

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

#### 6.4. Presentación y estudio estadístico de los resultados

En los tres tipos de experimentos se utilizó un diseño completamente al azar, distribuyendo las macetas de cada genotipo siempre de forma totalmente aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los experimentos fueron repetidos al menos una vez, considerándose los valores más representativos. Los datos originales así obtenidos (tablas del apéndice) se sometieron a un análisis estadístico consistente en:

- Análisis de la varianza multifactorial, con dos (genotipo y tratamiento) o tres entradas (genotipo, tratamiento y tiempo), según los casos
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias
- Test de Tukey, que compara fuentes de variación por separado
- Coeficientes de correlación simple entre variables

Los resultados se presentan en diagramas de barra o histogramas, gráficas y tablas de medias, que en todos los casos son resúmenes de datos que no se publican en esta memoria.

### 7. CARACTERIZACIÓN DE LA NADH-GLUTAMATO SINTASA DE LOS NÓDULOS DE *V. faba*

#### 7.1. Purificación parcial del enzima

##### 7.1.1. Preparación del extracto crudo

La extracción se realizó con un homogenizador Sorvall (USA, modelo Omnimixer 17106) en baño de hielo picado con un medio compuesto por fosfato potásico 20 mM pH 7.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5% y PMSF 1 mM. Se utilizaron 50 g de nódulos congelados, en nitrógeno líquido, de *V. faba*. La extracción se realizó en tandas de 12-13 g, con cinco volúmenes del medio de extracción, a velocidad máxima durante 6-7 períodos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos entre sí. El homogenado se filtró a través de dos capas de muselina y se centrifugó (Beckman, J2-21M) dos veces a 20000g y 4°C de temperatura durante 30 min, utilizando el sobrenadante, fracción citosólica del nódulo, para los siguientes pasos de purificación.

#### 7.1.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

El extracto crudo se sometió a una precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en polvo (Merck) entre el 30 y el 60% de saturación. Se centrifugó a 20000g durante 30 min y el precipitado se resuspendió en un tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5 y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.5% (tampón de corrida), en un volumen total 25 veces inferior al del extracto crudo de partida.

#### 7.1.3. Diálisis

El concentrado de proteínas obtenido por fraccionamiento con sulfato amónico se dializó durante 3 h, frente a 100 veces su volumen, con el tampón de corrida, anteriormente citado. Se realizaron cambios cada 30 min.

Tras la diálisis el concentrado proteico se centrifugó a 22000g durante 5 min, utilizándose el sobrenadante para los siguientes pasos de purificación.

#### 7.1.4. Cromatografía de intercambio iónico

El dializado se aplicó a una columna de 2.5 x 22 cm rellena de DEAE-sephacel previamente equilibrada con el tampón de corrida. Una vez introducida la muestra se lavó durante toda la noche con el mismo tampón añadido de KCl 0.1 M. La elución se realizó con gradiente lineal de KCl (0.1-0.4 M) en un volumen total 5 veces el volumen de la columna. El flujo se estableció con una bomba peristáltica (LKB), fue de 20 ml/h para la introducción de la muestra, aumentando hasta 40 ml/h en el lavado y en la elución. Con ayuda de un colector (LKB) se recogieron fracciones de 4.35 ml. Las fracciones con mayor actividad NADH-GOGAT se reunieron y se concentraron por ultrafiltración, utilizando una célula de amicon (modelo 8200) con membranas de 10 kDa (Diaflo) y los filtros Cx-30 (Millipore) acoplados a una bomba de vacío, hasta un volumen final de 5 ml.

#### 7.1.5. Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones concentradas procedentes del intercambio iónico se aplicaron a una columna de filtración en gel con un soporte de Sephacryl S-300 (1.5 x 38 cm). La columna se equilibró con el tampón de corrida. La elución se realizó con el mismo tampón a flujo de 15 ml/h, recogiendo fracciones de 3 ml. Las fracciones con actividad se concentraron y se almacenaron a  $-40^\circ\text{C}$  o se estabilizaron con glicerol al 20% a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### 7.1.6. Criterio de pureza

La pureza de la preparación proteica obtenida tras la exclusión molecular se examinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

La preparación de NADH-GOGAT obtenida se sometió a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS, según se describe en el apartado 7.2.1, obteniéndose una banda mayoritaria de proteína (Rf de 0.22) al teñir.

### 7.2. Separación de posibles isoenzimas de la NADH-GOGAT

#### 7.2.1. Preparación de extractos crudos

Se utilizaron 10 g de nódulos congelados de *V. faba* infectada por la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. La extracción se realizó según se detalla en el apartado 7.1.1.

#### 7.2.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Se realizó como se describe en el apartado 7.1.2. El precipitado entre el 30% y 60% de saturación de resuspendió en un volumen final de 3.6 ml.

#### 7.2.3. Diálisis

El concentrado de proteínas se dializó durante 3 h, frente a 100 veces su volumen en tampón de corrida con cambios cada 30 min.

#### 7.2.4. Cromatografía en DEAE-sepharosa

Tras la diálisis se aplicó a una columna (2.6x14.5 cm) de DEAE-sepharosa "Fast-Flow", resina de intercambio aniónico débil, con la que se pretendió eliminar proteínas que puedan interferir, previamente equilibrada con 5 volúmenes de tampón de corrida. Cuando se introdujo el dializado se lavó con 5 volúmenes del mismo tampón adicionado de KCl 0.1 M. La elución se realizó con gradiente lineal de KCl (0.1-0.4 M) en un volumen total de 400 ml. Se recogieron fracciones de 4.5 ml a flujo de 40 ml/h.

Las fracciones con mayor actividad NADH-GOGAT se reunieron y se concentraron con célula de amicón hasta un volumen final de 1 ml.



### 7.2.5. Diálisis

El concentrado se dializó con tampón de corrida durante 3 h, frente a 100 veces su volumen, realizándose cambios cada 60 min.

### 7.2.6. Cromatografía en Q-sepharosa

El dializado se aplicó a una columna (1.5x16 cm) de intercambio aniónico fuerte, Q-sepharosa "Fast-Flow" previamente equilibrada con tampón de corrida. Tras introducir la muestra se lavó con 5 volúmenes del mismo tampón adicionado de 0.1 M de KCl. La elución se realizó con gradiente lineal de KCl (0.1-1 M) en un volumen total 5 veces el de la columna utilizada. El flujo de trabajo fue 40 ml/h.

Las fracciones con actividad NADH-GOGAT se concentraron y se almacenaron a -40° C.

## 7.3. Técnicas electroforéticas

### 7.3.1. Electroforesis desnaturalizante

Se realizó en placa vertical según el sistema discontinuo de Laemmli (1970). El gel separador se preparó al 7% de acrilamida (acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%) en Tris-HCl 3 M pH 8.8 y SDS 0.1% (p/v) como agente desnaturalizante. Como catalizadores de la polimerización se utilizó persulfato amónico 0.075% (p/v) y TEMED 0.1% (v/v). Antes de añadir los catalizadores la mezcla del gel separador se desgasificó, se vertió en la placa y se dejó polimerizar, con el menisco cubierto por una capa de 3 a 5 mm de etanol al 70%, a temperatura ambiente y expuesta a la luz. Una vez polimerizado se elimina el etanol, se lava bien y se adiciona el gel concentrador que contenía Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, acrilamida 4%, SDS 0.1% (p/v) persulfato amónico 0.075% (p/v) y TEMED 0.069% (v/v).

Las cubetas de electroforesis utilizadas fueron LKB (2050 Midget) y Miniprotean (Biorad), las fuentes de alimentación LKB (MultiDrive XL) y Atom (502).

El tampón electrolito fue Tris 25 mM-glicina 190 mM pH 8.3, adicionado de SDS al 0.1% (p/v). La electroforesis se comenzó con una intensidad constante de 15 mA/gel hasta que el frente llegó al gel separador, momento en que se aumentó a 30 mA/gel.

Las proteínas utilizadas como marcadores del peso molecular, suministradas por Sigma, fueron: miosina (205 kD),  $\beta$ -galactosidasa (116 kD), fosforilasa b (97.4 kD), seroalbúmina (66 kD) y ovoalbúmina (43 kD).

Las muestras que se aplicaron, se prepararon en una relación 4/1 con una solución compuesta de Tris 0.36 M, glicerol 30% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 45% (v/v), SDS 18% (p/v), y azul de bromofenol 0.015% (p/v). Se calentaron a 100°C durante 5 min. La cantidad de proteína de cada muestra osciló entre 20 y 50  $\mu$ g.

### 7.3.2. Electroforesis en gradiente de acrilamida.

La electroforesis en gradiente de acrilamida se utilizó para determinar el peso molecular nativo de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*. Las placas se llenaron con un gel separador en el que se estableció un gradiente lineal entre 4.5 y 10% y un gel para concentrar las muestras que contenía acrilamida al 4%.

La preparación de los geles fue similar a la descrita en el apartado 7.2.1, excepto que éstos no contenían SDS.

Las proteínas marcadoras del peso molecular fueron: tiroglobulina (669 kD), ferritina (440 kD), catalasa (232 kD), lactato deshidrogenasa (140 kD) y albúmina bovina (68 kD).

La electroforesis se realizó en ausencia de agentes desnaturizantes y a una intensidad constante de 10 mA/gel inicialmente y de 20 mA/gel posteriormente.

Las muestras se prepararon con sacarosa al 10% (p/v) y azul de bromofenol al 7.7% (p/v). En cada pocillo se adicionó un total de 100  $\mu$ g de proteína procedente de extractos crudos.

### 7.3.3. Tinción de proteínas en geles

#### 7.3.3.1. Tinción con azul Coomassie

Las proteínas del gel se tiñeron, con azul Coomassie R-250 , 0.1% (p/v) en una solución de isopropanol al 25% (v/v) y acético al 10% (v/v) que permitió a su vez la fijación del gel, durante 30 min.

Para desteñir los geles se utilizó una mezcla de metanol al 40% y acético al 10%. Este procedimiento se utilizó tanto para geles nativos como desnaturizantes.

### 7.3.3.2. Tinción por actividad

#### 7.3.3.2.1. Tinción positiva

Se utilizó para geles nativos. Los geles se equilibraron con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM y β-metcaptoetanol 0.1% (v/v), durante 15 min. A continuación se incubó con el mismo tampón adicionado de α-cetoglutarato 2.5 mM, NADH 1.5 mM y L-glutamina 10 mM durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se lavó 3 veces con Tris-HCl 100 mM pH 8.5 y se incubó en una solución con el mismo tampón adicionado de nitroblue tetrazolium (Sigma) 25% (p/v) y phenazina metosulfato (Sigma) 3% (p/v).

La banda de NADH-GOGAT se diferencia clara frente al fondo morado del resto del gel, debido a que en la zona donde está el enzima, el NADH se ha oxidado para dar NAD<sup>+</sup>.

#### 7.3.3.2.2. Tinción negativa

Consiste en detectar la actividad enzimática por su capacidad diaforasa. Para ello se equilibró el gel y se incubó con fosfato potásico 50 mM pH 7.5, Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM y β-metcaptoetanol 0.1% (v/v), α-cetoglutarato 2.5 mM, aminooxiacetato 1 mM, NADH 0.15 mM, L-glutamina 10 mM y nitroblue tetrazolium 25% (p/v) hasta que apareció una banda lila que correspondía a la NADH-GOGAT frente al fondo transparente del resto del gel. En este caso se tiñe la actividad enzimática que capta el NADH, cuando las condiciones del medio son propicias.

### 7.4. Determinación del peso molecular por filtración en gel

Para hacer una segunda aproximación del peso molecular nativo de la NADH-GOGAT de nódulos efectivos de *V. faba*, se utilizó una filtración en gel, sephacryl S-300 "Fast-Flow" equilibrado en una columna de 1.5 x 66 cm con el tampón de corrida adicionado de KCl 0.1M para evitar posibles interacciones con la matriz de la resina. La elución se realizó con el mismo tampón a flujo de 50 ml/h, recogándose fracciones de 1ml.

La columna fue calibrada con los pesos moleculares de las siguientes proteínas patrón: tiroglobulina (8 mg/ml), apoferritina (10 mg/ml), β-amilasa (4 mg/ml), alcohol deshidrogenasa (10 mg/ml), albúmina bovina (10 mg/ml) y anhidrasa carbónica (3 mg/ml). Para la obtención del volumen vacío de la columna se utilizó azul dextrano (5 mg/ml).

Se utilizó una muestra de 1 ml con la actividad NADH-GOGAT concentrada por precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a partir de un extracto crudo. La muestra contenía 1 mg de proteína/ml.

Tanto las preparaciones de las proteínas patrón como la de la muestra se adicionaron de glicerol al 5% para que la entrada en el gel de la proteína fuese uniforme.

## 7.5. Técnicas inmunológicas

### 7.5.1. Obtención de anticuerpos

#### 7.5.1.1. Inmunización del conejo

Se utilizaron conejos de raza híbrida Nueva Zelanda-California de 4 kg de peso. La inmunización se realizó a partir de bandas de electroforesis en geles de acrilamida (7%), componente que potencia la respuesta inmunológica por lo que no fue necesario utilizar el adyuvante de Freund.

Para que la cantidad de proteína NADH-GOGAT pura alcanzara la dosis, como mínimo, de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso del conejo, se consideró que la cantidad de NADH-GOGAT pura en el carril de electroforesis era el 30% de la proteína total.

Una vez cortada, la banda correspondiente al peso molecular calculado para la NADH-GOGAT, se equilibró en tampón Tris-HCl 50 mM pH 6.8 y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Antes de cada inyección se maceró con el mismo tampón hasta un volumen final de 4 a 5 ml, quedando una mezcla pastosa que se inyectó subcutáneamente en 8 ó 10 pinchazos repartidos por el lomo del animal.

El calendario de inyecciones y sangrías fue el que se describe en la tabla 3.

Las extracciones se realizaron a partir de la vena marginal de la oreja.

**Tabla 3.** Protocolo de inmunización del conejo y de obtención del suero, con un total de 6 pinchazos y 3 sangrías. En la última sangría se sacrificó al conejo.

Días	0	14	28	42	49	84	94	126	136
Dosis inyectadas ( $\mu\text{g}$ )	150	100	100	100	-	100	-	100	-
Nº de pinchazo	1º	2º	3º	4º		5º		6º	
Sangrías (ml)	-	-	-	-	50	-	50	-	50
Nº de sangría					1ª		2ª		3ª

### 7.5.1.2. Obtención del suero

La sangre extraída en cada una de las extracciones se repartió en tubos de centrifuga y se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a 11000g durante 15 min, quedando el suero en la parte superior, separado de la fase celular. El complemento se inactivó calentando el suero a 56°C durante 10 min.

El suero así tratado se repartió en tubos eppendorf a razón de 500 µl y se almacenó a -20°C.

## 7.5.2. Métodos inmunológicos

### 7.5.2.1. Titulación de los anticuerpos

Se utilizaron extractos crudos como se describe en el apartado 6.2.2.1. Alícuotas de 100 µl se incubaron con cantidades crecientes (5-60 µl) de antisuero y PBS (50 mM fosfato potásico-KOH pH 7.2, NaCl 150 mM), hasta un volumen final de 0.4 ml. Esta mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 12 h. Pasado este tiempo, también a 4°C, se incubó en agitación, con 100 µl de proteína A-sepharosa al 10% (p/v) y bloqueada con albúmina bovina (Fracción V, Sigma) para evitar uniones inespecíficas de otras proteínas del suero. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 2500g con una temperatura de 4°C, utilizándose el sobrenadante para medir la actividad enzimática. De esta forma la titulación del anticuerpo se realiza midiendo la actividad enzimática residual del sobrenadante tras la inmunoprecipitación del antígeno.

Esta técnica fue idéntica cuando se utilizó suero preinmune.

### 7.5.2.2. Liberación de los complejos antígeno-anticuerpo de la proteína A-sepharosa para usarlos en electroforesis

Tras la titulación de los anticuerpos el sedimento de proteína A-sepharosa que quedó tras eliminar el sobrenadante destinado a medir la actividad enzimática se trató como se describe a continuación:

- Se lavó tres veces con PBS.
- Se volvió a lavar dos veces con el mismo tampón adicionado de SDS al 0.1% (p/v).
- Al precipitado final, se le añadió 25 µl de una mezcla formada por, Tris 24 mM pH 6.8, glicerol 50% (v/v), β-mercaptoetanol 15% (v/v), SDS 6% (p/v) y azul de

bromofenol 0.005% (p/v) y se hirvió durante 5 min a 100°C. El sobrenadante que quedó se utilizó para electroforesis en geles de acrilamida.

### 7.5.2.3. Ensayo de especificidad de los anticuerpos. "Western blot"

#### a) Transferencia de proteínas

Consiste en transferir las proteínas desde un gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó una técnica en semiseco empleando el equipo Multiphor II NovaBlot (LKB).

La electroforesis se realizó en SDS como se detalla en el apartado 7.2.1. Una vez finalizada la electroforesis el gel se incubó durante 5 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM-glicina 190 mM pH 8.3 y metanol 20% (v/v)). A continuación se preparó una unidad de transferencia formada por 6 piezas de papel de filtro empapadas en dicho tampón que se reparten en dos tandas entre las que se coloca el conjunto formado por el gel de acrilamida y la membrana de nitrocelulosa estableciéndose una estructura tipo "sanwich" que se colocó con la correspondiente orientación entre los polos de grafito. A su vez éstos últimos van protegidos por 6 capas, cada uno, de papel de filtro empapado en tampón de transferencia. La transferencia se realizó a una intensidad constante de 45 mA/gel durante 2 h.

#### b) Tinción con anticuerpos

Una vez realizada la transferencia la membrana de nitrocelulosa se trató según el protocolo que se menciona a continuación:

- Bloqueo en una solución compuesta por TBS (Tris 20 mM pH 8.2, NaCl 0.9% (p/v)), leche en polvo (Molico) 2% (p/v) y Tween 20 0.05% (v/v), durante toda la noche.
- Lavado 3 veces durante 10 min con TBS, leche en polvo 0.05% (p/v) y Tween 20 0.05% (v/v).
- Incubación con una solución de antiNADH-GOGAT (dilución 1:100 del suero) en TBS, albúmina bovina 0.5% (p/v) y Tween 20 0.05% (p/v), durante 2 h 30 min.
- Lavar 4 veces durante 10 min con TBS, leche en polvo 0.05% (p/v) y Tween 20 0.1% (v/v).
- Incubar durante 1 h 30 min con anticuerpos de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo (Sigma) ligados a peroxidasa, dilución 1:8000, preparados en una solución de TBS,

leche en polvo 1% (p/v) y Tween 20 0.05% (v/v).

- Lavar 3 veces durante 15 min con TBS, leche en polvo 0.05% (p/v) y Tween 20 0.1% (v/v).

- Lavar 15 min con una solución de TBS, leche en polvo 0.05% (p/v), SDS 0.05% (p/v) y Tween 20 1% (v/v).

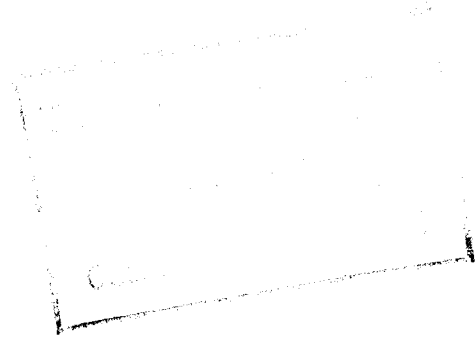
- Mantener 15 min en agua destilada.

- El revelado de las bandas se realizó, con 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) al 30% (p/v) preparada en fosfato sódico 20 mM pH 6 a la que se le añadió peróxido de hidrógeno (Flucka) 0.1% (v/v) o, con 4-cloro-1-naptol (Sigma) preparado al 0.1% (p/v) en PBS (fosfato potásico 10 mM pH 7.5, ClNa 150 mM) y adicionado de peróxido de hidrógeno 0.05% (v/v).

- En ambos casos, una vez aparecida la banda, la reacción se paró con abundante agua destilada.

### **c) Tinción con negro amido**

Se utilizó para teñir el patrón de proteínas y de esta forma comprobar si la transferencia ha sido buena. La tinción se realizó sumergiendo la membrana durante 2 min en una solución de negro amido preparado al 1% (p/v) en acético al 10% (v/v) y metanol al 5% (v/v). El exceso de colorante se elimina con agua destilada.



## **Resultados y Discusión**



## 1. CURVAS DE CRECIMIENTO Y DE RESISTENCIA AL NaCl DE *R. leguminosarum* biovar. *viciae*

### 1.1. Influencia de distintos niveles de NaCl en el crecimiento de la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* biovar. *viciae*

Con objeto de estudiar la viabilidad y resistencia de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* al NaCl, se ha realizado un seguimiento del crecimiento de la cepa GRA19 en medio líquido adicionado de distintas concentraciones, 50, 75 y 100 mM. También se ha seguido el crecimiento sin sal como referencia o control.

El crecimiento de los cultivos tratados y del control se evaluó por D.O. a 620 nm y por número de células viables/ml. Los resultados se muestran en la figura 1.1, donde se observa la relación de D.O. a 620 nm con el número de células viables/ml para cada concentración de NaCl ensayada, así como la disminución de viabilidad en las células que crecen en su presencia.

Cuando el crecimiento se representa en función de la D.O. a 620 nm, el perfil obtenido en presencia de 50 mM de NaCl coincide con el obtenido para el control. Si al medio de crecimiento adicionamos concentraciones de 75 y 100 mM de NaCl se detecta una disminución en la pendiente de la fase logarítmica que conlleva a valores máximos de crecimiento mucho menores que el control, aunque la fase estacionaria se alcanza al mismo tiempo de cultivo (24h).

El número de células viables/ml disminuye respecto al control en todas las concentraciones de NaCl ensayadas. En el crecimiento a 50 mM de NaCl se observa que la transición a población estacionaria se hace mayor. El crecimiento a 75 y 100 mM de NaCl presenta perfiles muy parecidos, al inicio se observa una fase de adaptación o fase *lag*, en la que el número de células viables/ml aumenta muy poco, continúa con un crecimiento logarítmico que entra rápidamente en una fase de muerte, fase que se hace más acentuada cuanto mayor es la concentración de NaCl.

El efecto del NaCl en todas las concentraciones ensayadas se hace más patente a nivel de número de células viables/ml, esto es consecuencia de los cambios a nivel celular que se suceden en medio salino y que afectan a las lecturas de D.O. a 620 nm.

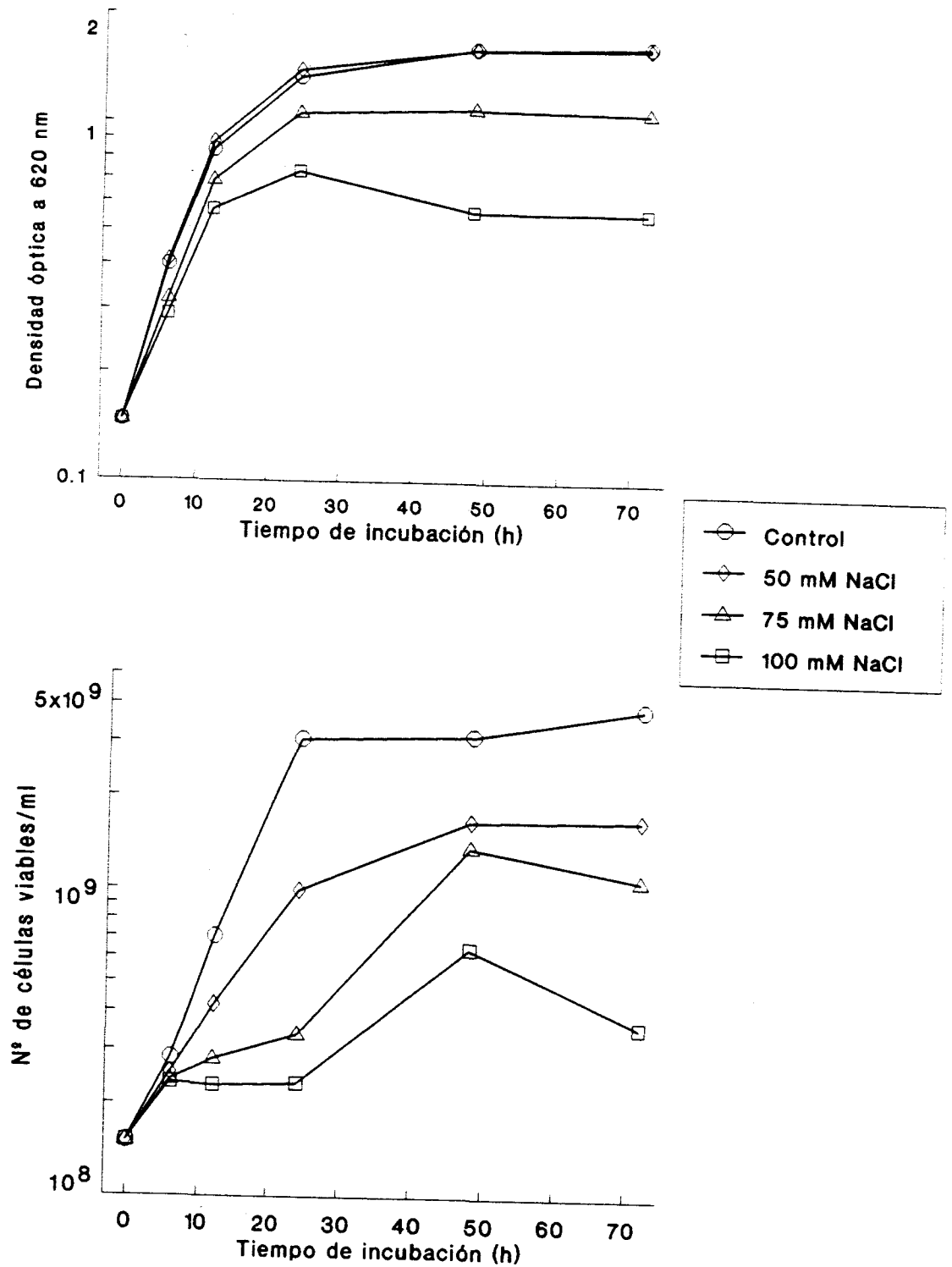


Figura 1.1. Curvas de crecimiento en D.O. a 620 nm y número de células viables/ml, de la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* en medio líquido adicionado de distintas concentraciones de NaCl, 50, 75 y 100 mM. También se mantuvo un cultivo control sin NaCl.

En la tabla 1.1 se representan los porcentajes de D.O. a 620 nm y número de células viables/ml respecto al control, para las concentraciones de NaCl estudiadas a lo largo de todo el período de crecimiento, los datos obtenidos nos permiten determinar la tolerancia al NaCl de la cepa estudiada. A 75 mM de NaCl se mantiene un porcentaje del 68%, con una viabilidad celular apreciable. A 100 mM de NaCl tampoco se produce una total inhibición del crecimiento bacteriano.

**Tabla 1.1.** Porcentajes de D.O. a 620 nm y número de células viables/ml respecto al control, desde las 0 h hasta las 72 h de crecimiento, de la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* ensayada a 50, 75 y 100 mM de NaCl. Los datos son media de 3 repeticiones.

Horas de incubación	Concentración de NaCl (mM)					
	50		75		100	
	D.O.	Céls/ml	D.O.	Céls/ml	D.O.	Céls/ml
0	100	100	100	100	100	100
6	103	89	80	86	73	86
12	105	60	82	40	68	33
24	105	32	80	11	54	7
48	99	53	68	43	35	20
72	99	43	65	28	35	35

Respecto al tiempo de generación (Tab. 1.2), sufre un incremento conforme aumenta el NaCl en el medio de crecimiento, lo que nos informa a cerca de la dificultad que encuentra la bacteria cuando crece en presencia de NaCl. A 50 mM de NaCl se experimenta una duplicación del tiempo de generación y a su vez un descenso, aproximadamente a la mitad, de la población máxima, debido a que la fase logarítmica dura el mismo tiempo (12 h). Los resultados obtenidos para ambos parámetros cuando las bacterias crecieron a 75 mM de NaCl son parecidos a los obtenidos para 50 mM, sin embargo no son comparables a los de 100 mM, donde el número de células desciende a la tercera parte y el tiempo de generación se triplica respecto al control. Este incremento en el tiempo de generación y el descenso en el número de células viables/ml, fue observado igualmente para determinadas cepas de *R. meliloti* cuando crece en medio salino (Abdelkader *et al.*, 1987).

Tabla 1.2. Características culturales expresadas en tiempo de generación en h y en número máximo de células viables/ml, obtenidos para la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* crecida a distintas concentraciones de NaCl, 0 (control), 50, 75 y 100 mM.

Concentración de NaCl (mM)	Tiempo de generación (h)	Población máxima (cels · ml <sup>-1</sup> · 10 <sup>9</sup> )
Control	5.20	3.17
50	10.10	1.67
75	11.94	1.37
100	16.25	0.64

## 1.2. Crecimiento de distintas cepas de *R. leguminosarum* biovar. *viciae*.

Con objeto de comprobar si la alta viabilidad celular obtenida para la cepa GRA19 de *R. leguminosarum* biovar. *viciae* en presencia de NaCl se mantiene, se ensayaron 11 cepas silvestres seleccionadas entre las que se utilizan usualmente en nuestro grupo de investigación, las cuales crecieron a 75 mM de NaCl. Para que los datos de crecimiento entre cepas diferentes fuesen comparativos y a modo de control, crecieron igualmente en medio sin NaCl.

En la figura 1.2 se representan las gráficas de crecimiento, según D.O. a 620 nm en función del tiempo, para el control y 75 mM de NaCl. De estos resultados podemos concluir que todas las cepas ya han llegado al punto máximo de crecimiento a las 48 h, por tanto, dicho punto se puede utilizar para hacer porcentajes de D.O. respecto al control (Tab. 1.3) y de esta forma comparar resistencia al NaCl entre cepas. De esta tabla se puede concluir que son 3 las cepas que presentan un alto porcentaje de crecimiento a 75 mM de NaCl tras 48 h de crecimiento, las cepas GRI32, GRA19 y GRL8, con porcentajes del 73, 68 y 62%, respectivamente. El resto de las cepas presentan porcentajes de crecimiento comprendidos entre 11 y 28%, resultados que distan de los obtenidos para las 3 cepas mencionadas anteriormente.

La cepa GRA19 está perfectamente caracterizada por nuestro grupo de investigación, ésto junto al alto porcentaje de crecimiento que presenta en vida libre a 75 mM de NaCl y a sus características de efectividad, infectividad y competitividad (Hervás, 1991), hizo que se eligiera para los experimentos realizados en el estudio del efecto del NaCl en la simbiosis *Vicia faba*-*Rhizobium leguminosarum*.

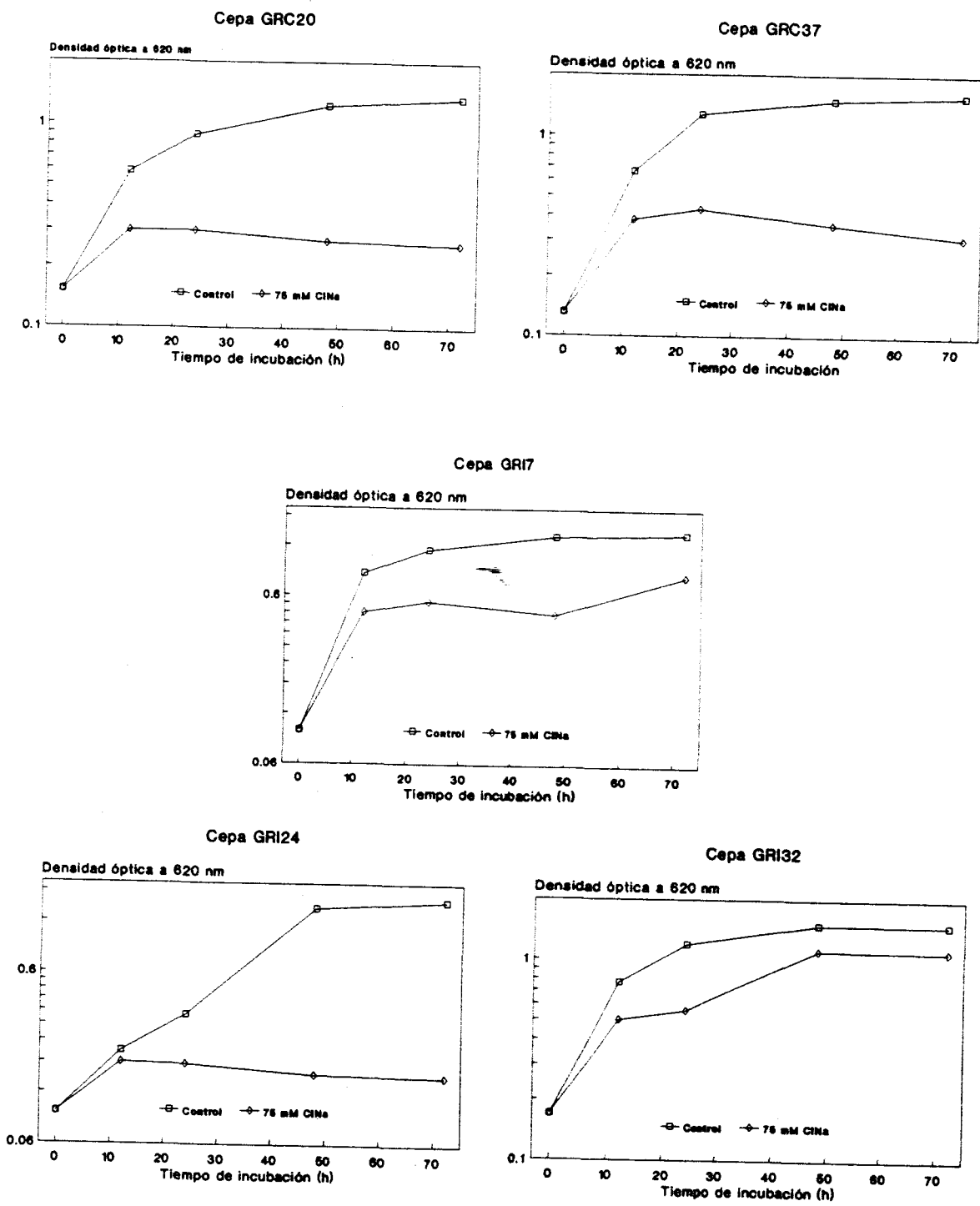


Figura 1.2. A. Curvas de crecimiento en D.O. a 620 nm de distintas cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* en medio líquido adicionado de NaCl a 75 mM. De cada una de ellas se mantuvo un cultivo control sin sal.

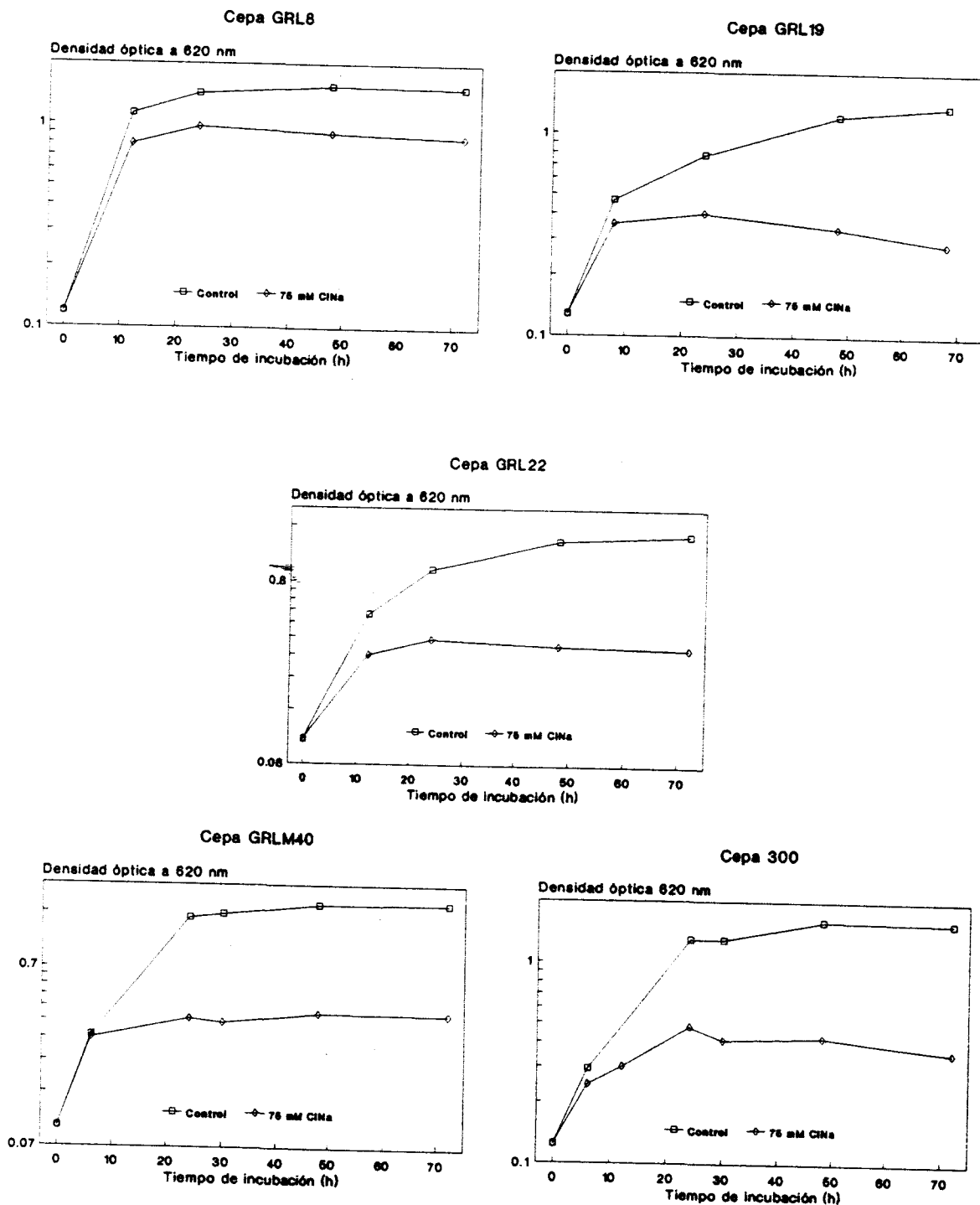


Figura 1.2. B. Curvas de crecimiento en D.O. a 620 nm de distintas cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* en medio líquido adicionado de NaCl a 75 mM. De cada una de ellas se mantuvo un cultivo control sin sal.

Tabla 1.3. Porcentaje de D.O. a 620 nm respecto al control de distintas cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* crecidas a 75 mM de NaCl durante 48 h.

Cepa	%	Cepa	%	Cepa	%
GRC20	22	GRI7	34	GRL8	58
GRC37	24	GRI24	11	GRL19	28
300	26	GRI32	74	GRL22	27
GRA19	68			GRLM40	25

## 2. DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y DE LAS ACTIVIDADES DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS DE *Vicia faba*

Con este estudio se pretendió caracterizar la evolución de la simbiosis establecida entre la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y el cv. Alborea de *V. faba* a lo largo de las distintas etapas del desarrollo de la planta, etapa vegetativa y etapa reproductora. Los ensayos comenzaron antes de que aparecieran nódulos (10 días) y se continuaron hasta fructificación (45-50 días). El largo período de mantenimiento del cultivo fue posible gracias al sistema de cultivo hidropónico utilizado.

### 2.1. Crecimiento, nodulación y acumulación de nitrógeno en planta

El acúmulo de materia seca sigue una curva de crecimiento en el tiempo (Fig. 2.1) que se estabiliza desde los 44 días en torno a  $0.32 \text{ g} \cdot (\text{planta})^{-1}$ . Esto se traduce en un brusco descenso en la TCR que se representa en la misma figura. A los 44 días de crecimiento la planta se encuentra bien entrado el período reproductor.

Los valores de la relación R/PA (Fig. 2.2) se traducen en un desarrollo primario de la raíz hasta los 18 días, a partir de aquí empieza a predominar la parte aérea con valores menores de 0.5, experimentándose un crecimiento predominante de la parte aérea. Gracias a nuestro sistema de cultivo la planta invierte la mayoría de su energía en el crecimiento de la parte aérea vegetativa, lo que favorece a su vez un incremento de la fotosíntesis estableciéndose un sistema productivo hasta llegar a floración.

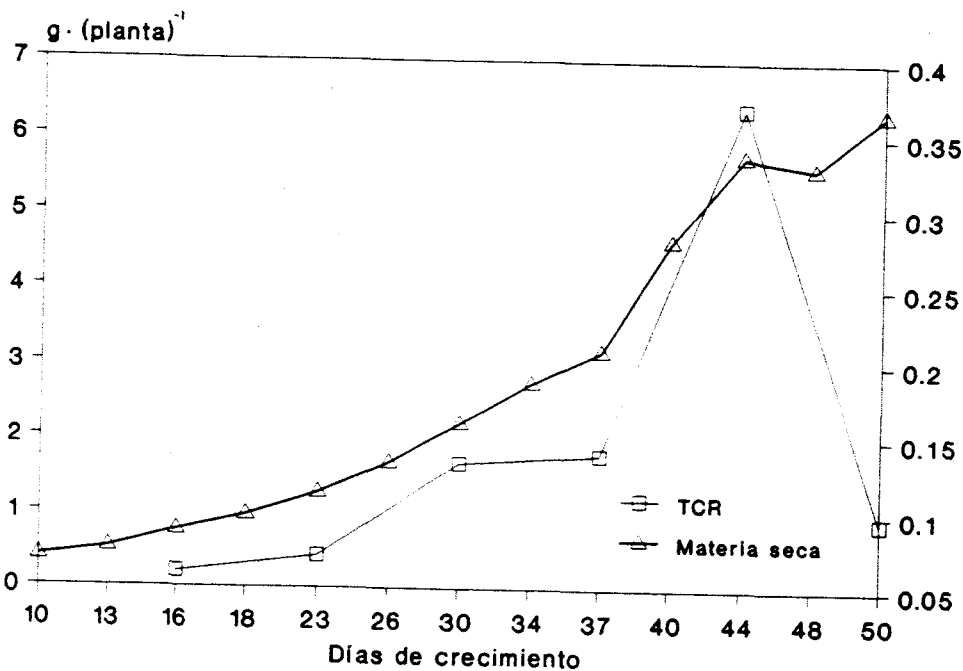


Figura 2.1. Acumulación de materia seca, expresada en  $g \cdot (planta)^{-1}$ , y tasa de crecimiento relativo, expresada en  $g \cdot (día)^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y mantenidas durante 50 días en cámara de cultivo. MDS (0.05) = 0.9

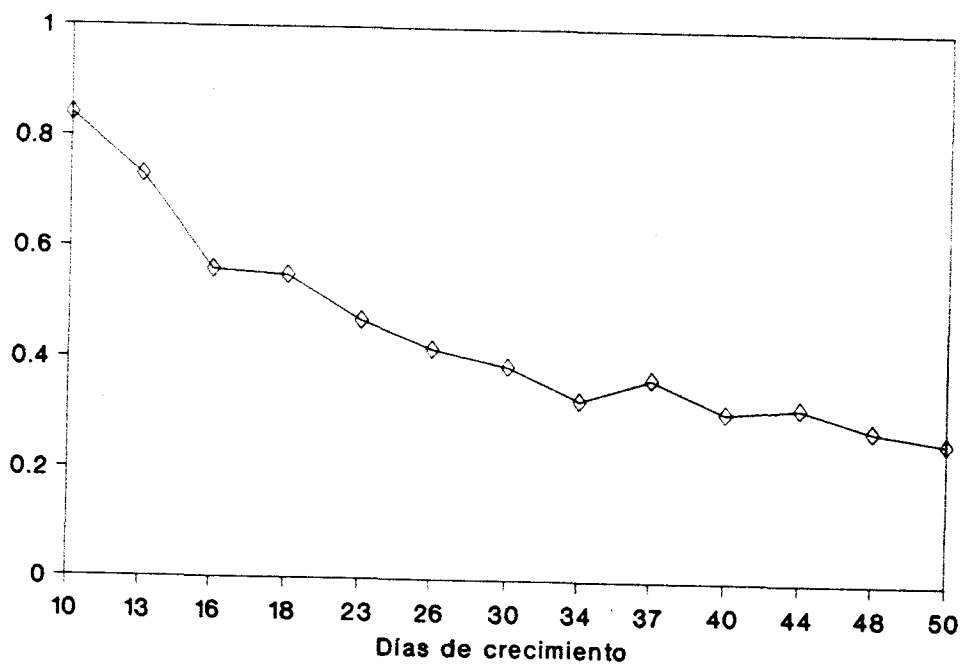
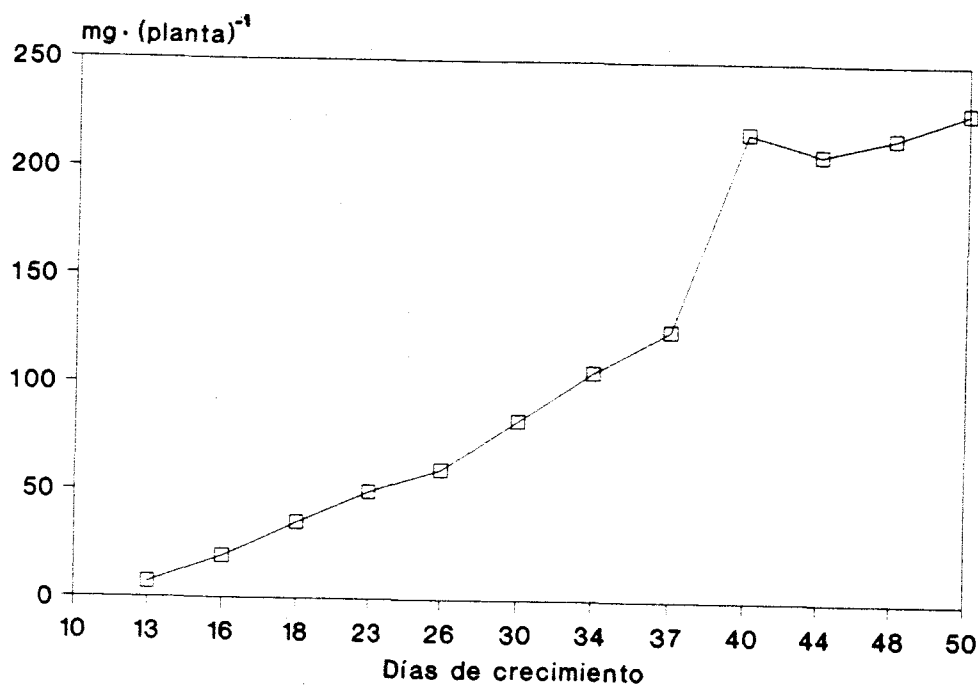


Figura 2.2. Relación raíz/parte aérea de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y mantenidas durante 50 días en cámara de cultivo. MDS (0.05) = 0.07





**Figura 2.3.** Peso seco de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y mantenidas durante 50 días en cámara de cultivo. A los 10 días de crecimiento no hay datos de peso seco de nódulos porque aún no se han diferenciado.  
MDS (0.05) = 41.56

Las plantas inoculadas en el momento de la siembra, día 0, no presentaron nódulos diferenciados hasta 13 días después. A partir de este momento, la masa nodular experimentó un incremento progresivo hasta los 40 días. Desde los 40 hasta los 50 días se mantuvo estable, no aparecen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2.3). Esto se debe a que la planta pasa del período vegetativo al período reproductor, entra en floración y la mayoría de los nutrientes se desplazan hacia los focos de formación de los órganos reproductores.

El peso normalizado de nódulos (Tab. 2.1) que relaciona la masa nodular con el crecimiento de la parte aérea va aumentando hasta los 18 días, momento en que se estabiliza hasta el final del tiempo de cultivo.

Tabla 2.1. Cambios en el peso normalizado de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , a lo largo de 50 días de crecimiento de plantas de *Vicia faba* L. cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*.

Día	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	Día	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	Día	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
13	23.50	26	52.43	40	63.99
16	42.35	30	59.56	44	49.63
18	59.27	34	55.10	48	51.23
23	60.54	37	60.03	50	47.19
MDS (0.05)		10.34			

El contenido en nitrógeno orgánico (Fig. 2.2) por planta aumenta en el tiempo hasta los 44 días, en que se estabiliza. En este momento la planta se encuentra en fructificación y el crecimiento ya se ha estabilizado, por lo que el nitrógeno acumulado se dirigirá hacia la vainas en formación. Estos datos se completan con los valores en tasa de adquisición de nitrógeno que se expresan en la misma figura.

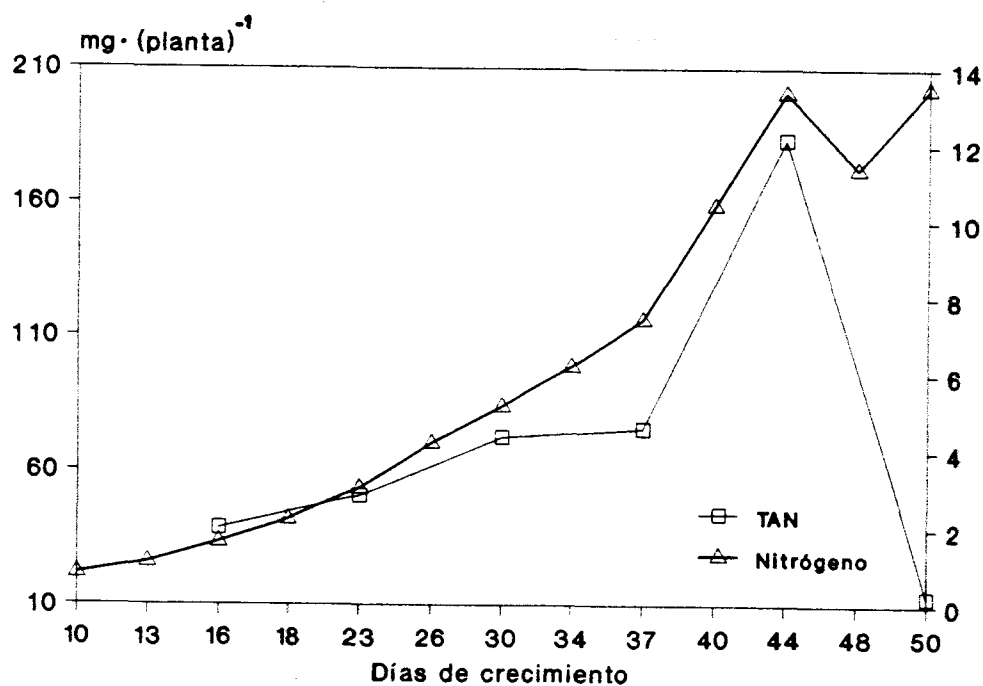


Figura 2.4. Contenido en nitrógeno reducido, expresado en  $\text{mg N.} \cdot (\text{planta})^{-1}$  y tasa de adquisición del mismo, expresada en  $\text{mg N.} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y crecidas durante 50 días en cámara de cultivo. MDS (0.05) = 10.3

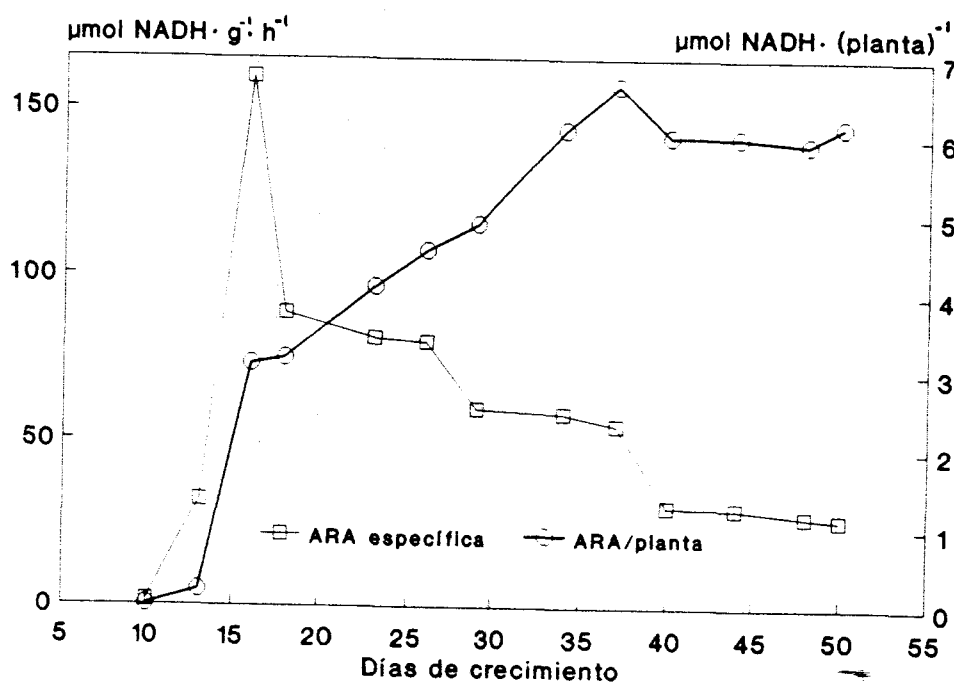


Figura 2.5. Evolución a lo largo de 50 días de crecimiento, de la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (a) y en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (b), en nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. (a) MDS (0.05) = 1.38, (b) MDS (0.05) = 11.89

## 2.2. Actividades de la nitrogenasa: Eficiencia relativa

La evolución de la actividad nitrogenasa, valorada mediante el test de reducción de acetileno (ARA) y expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (actividad específica) se representa en la figura 2.4. A los 16 días de crecimiento la actividad experimentó un incremento brusco que ya no se detecta a los 18 días. A partir de aquí la actividad decae poco a poco hasta que se estabiliza en un valor mínimo [ $\approx 28 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ] a partir de floración (40 días). El incremento brusco de ARA específica responde a una necesidad fisiológica de la planta que cuenta aún con poca masa nodular, masa que aumenta rápidamente y por tanto, se implica una disminución de esta actividad. Esta disminución es lógica si pensamos que el fotosintato procedente de la fotosíntesis no sería suficiente para mantener esta actividad ARA específica tan elevada en mayores masas nodulares.

Cuando la actividad ARA se expresó en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Fig. 2.4) se

observó un aumento prolongado desde el inicio del cultivo. A los 16 días se produce un gran aumento que se debe a la gran potencialidad del escaso tejido nodular (datos de actividad específica), potencialidad que disminuye conforme aumenta la masa nodular hasta que se llega a un equilibrio entre ambos a partir de los 34 días (aparición de nódulos florales), entrando la actividad en fase estacionaria con valores aproximados de  $6 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

La producción de hidrógeno en aire (Tab. 2.4), a lo largo del período de crecimiento. Los valores obtenidos manifestaron una proporcionalidad directa con los valores en actividad específica para la ARA, excepto en el día 18 de crecimiento, de forma que la eficiencia relativa (Tab. 2.4) de la actividad nitrogenasa se mantiene igual a lo largo del cultivo y con valores próximos a 1.

**Tabla 2.4.** Evolución a lo largo de 50 días de cultivo de la producción de hidrógeno en aire por la nitrogenasa, expresada en  $\mu\text{mol H}_2 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y de la eficiencia relativa de la fijación de nitrógeno, en nódulos de *V. faba* cv. Alborea inoculada con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*.

Día	H <sub>2</sub> producido	Eficiencia relativa	-Día	H <sub>2</sub> producido	Eficiencia relativa
16	4.11	0.97	37	7.50	0.86
18	12.49	0.85	40	4.81	0.85
23	12.40	0.84	44	4.51	0.84
26	14.94	0.81	48	8.41	0.86
30	12.37	0.79	50	4.08	0.85
34	11.18	0.81			
MDS (0.05)	3.71				

### 2.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

El  $\text{NH}_4^+$  que se forma tras la fijación de  $\text{N}_2$  se puede asimilar a compuestos orgánicos por diversas rutas. La ruta más operativa sería la del ciclo GS-GOGAT. La glutamina sintetasa posee una alta afinidad por el amonio catalizando su incorporación al glutamato para formar glutamina por amidación y para lo que se requiere un aporte energético de ATP. A continuación actuaría la NADH-glutamato sintasa que cataliza la formación de una molécula de glutamato a partir de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato con aporte

de poder reductor en forma de NADH.

Una ruta alternativa sería la de la NADH-GDH que cataliza la incorporación del amonio sobre el  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato. Este enzima tiene una Km muy elevada para el amonio, por lo que sólo actúa cuando los niveles son muy elevados o cuando los niveles de glutamina son elevados.

De esta forma caracterizamos las rutas metabólicas que podrían inducirse en caso de que la producción de prolina en los nódulos, bajo condiciones de estrés en experimentos posteriores, se estimulara por procesos catabólicos.

Las actividades GS y NADH-GOGAT (Fig. 2.4) alcanzan su máximo a los 23 días de crecimiento, como reacción inmediata al disparo de actividad ARA específica de la nitrogenasa. La actividad NADH-GOGAT se mantiene con valores máximos ( $\approx 130 \mu\text{mol NADH}_{\text{ox}} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) hasta los 34 días, momento en que se estabiliza la actividad ARA por planta, siguiendo de esta forma unas pautas muy delimitadas por la actividad ARA y formando un diseño gráfico en forma de campana de "Gaus". Sin embargo, la actividad GS decae muy poco, manteniéndose practicamente estable hasta el final.

En lo que respecta a la actividad NADH-GDH también experimenta un leve incremento, poco significativo, a los 23 días de crecimiento, manteniéndose en este valor hasta el final, siendo una enzima poco funcional en nódulos crecidos en estas condiciones.

El estudio de la evolución de la cantidad de proteína soluble a lo largo del período de cultivo (Tab. 2.5) nos permite diferenciar tres etapas diferentes, la primera en que incrementa progresivamente hasta los 18 días, la segunda, desde los 23 días hasta los 34 días, en la que aparecen los máximos valores ( $\approx 13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) y la tercera, con valores en torno a  $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  y que se mantiene hasta el final del cultivo.

Tabla 2.5. Contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ , a lo largo de 50 días de crecimiento de nódulos de plantas de *Vicia faba* L. cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*.

Día	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$	Día	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$	Día	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$
10	2.69	26	13.25	40	10.59
13	7.31	30	13.238	44	10.35
16	9.87	34	13.17	48	9.33
18	12.25	37	11.88	50	10.62
23	13.78				
MDS (0.05)			1.12		

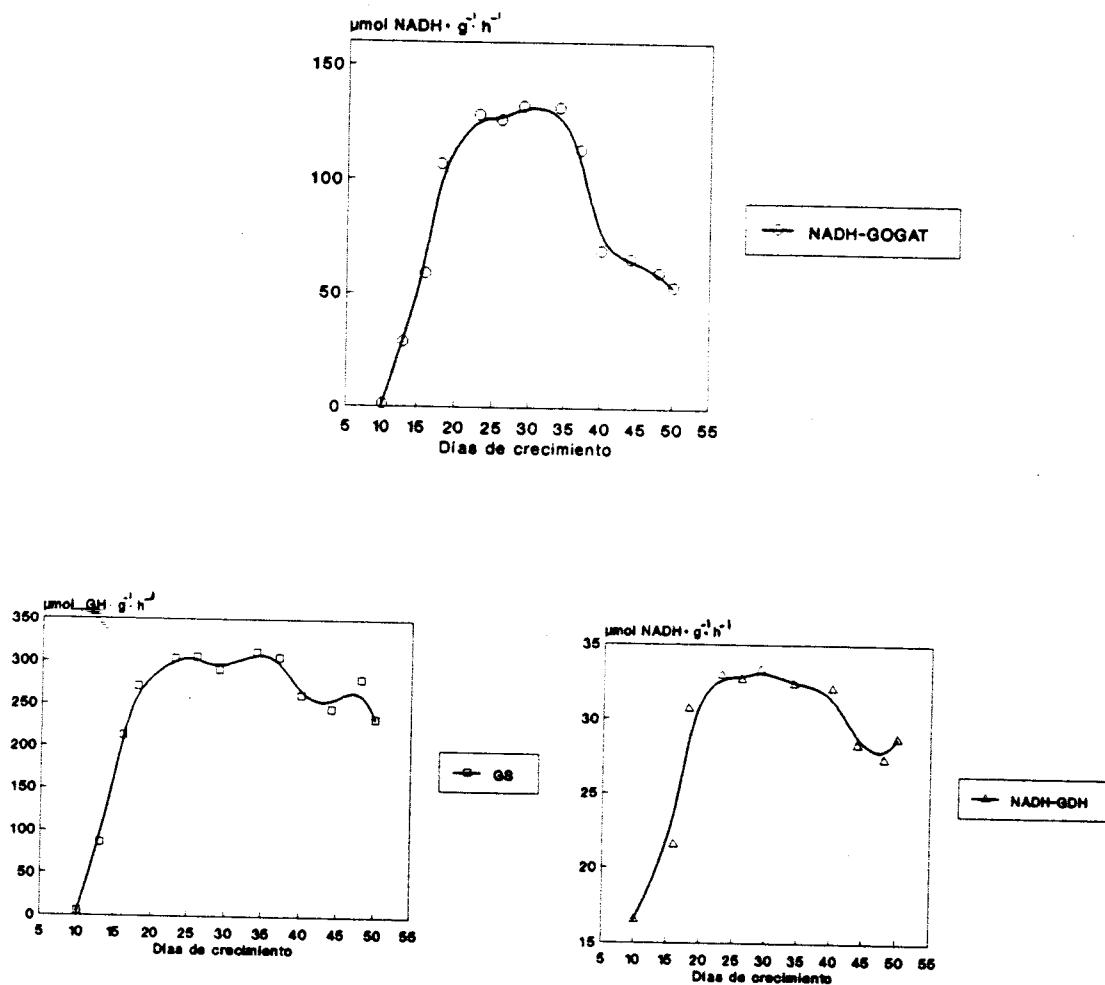


Figura 2.6. Evolución, a lo largo de 50 días de crecimiento, de las actividades enzimáticas, NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol} \cdot \text{NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (a), GS, expresada en  $\mu\text{mol} \gamma\text{GH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (b), y NADH-GDH, expresada en  $\mu\text{mol} \cdot \text{NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (c), de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. (a) MDS (0.05) = 2.36, (b) MDS (0.05) = 7.75, (c) MDS (0.05) = 1.42

**Tabla 2.4.** Matriz de correlación simple entre variables determinadas, en plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, a lo largo de un período de 50 días de crecimiento. Las variables son: PSP, peso seco por planta; TCR, tasa de crecimiento relativo; RPA, relación raíz/parte aérea; PSN, peso seco de nódulos; PNN, peso normalizado de nódulos; ARA, actividad específica de la nitrogenasa; H<sub>2</sub>, producción de hidrógeno en aire por la nitrogenasa; ER, eficiencia relativa; ARAP, ARA por planta; GS, glutamina sintetasa; GG, glutamato sintasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; PRT, contenido en proteína soluble; NIT, nitrógeno.

	PSP	TCR	RPA	PSN	PNN	ARA	H <sub>2</sub>	ER	ARAP	GS	GG	GDH	PRT	NIT
PSP	1.000													
TCR	0.586	1.000												
RPA	-0.929	-0.480	1.000											
PSN	0.997	0.587	-0.948	1.000										
PNN	-0.245	-0.053	-0.086	-0.177	1.000									
ARA	-0.822	-0.537	0.951	-0.855	-0.341	1.000								
H <sub>2</sub>	-0.527	-0.276	0.220	-0.483	0.861	-0.031	1.000							
ER	0.543	0.358	-0.764	0.595	0.664	-0.915	0.378	1.000						
ARAP	0.789	0.495	-0.890	0.829	0.264	-0.876	-0.197	0.757	1.000					
GS	-0.270	-0.849	-0.052	-0.200	0.994	-0.303	0.831	-0.637	0.265	1.000				
GG	-0.514	-0.212	0.189	-0.457	0.945	-0.065	0.956	0.417	-0.038	0.932	1.000			
GDH	0.070	0.058	-0.391	0.126	0.890	-0.616	0.803	0.850	0.373	0.850	0.793	1.000		
PRT	-0.422	-0.289	0.103	-0.372	0.907	-0.149	0.980	0.505	-0.072	0.885	0.947	0.869	1.000	
NIT	0.997	0.642	-0.929	0.997	-0.208	-0.839	-0.505	0.567	-0.808	-0.233	-0.482	0.095	-0.404	1.000

Valor crítico (0.05) = 0.190

Valor crítico (0.01) = 0.248

### 3. PARCIAL PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL CICLO GLUTAMATO SINTASA EN LA FRACCION VEGETAL DE NODULOS DE *V. faba*

La NADH-GOGAT de la fracción citosólica de nódulos de *V. faba* se ha purificado 74 veces, con una actividad específica aproximada de  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}$  de proteína y un rendimiento final del 32% (Tab. 3.1).

**Tabla 3.1.** Parcial purificación de la NADH-GOGAT de la fracción vegetal de nódulos de *V. faba* inoculada con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. La tabla es media de 6 experimentos

Etapa de purificación	Actividad total	Proteína total	Actividad específica	Purificación	Rendimiento
	<i>unidades</i>	<i>mg</i>	<i>unidades · mg proteína<sup>-1</sup></i>	<i>veces</i>	<i>%</i>
Extracto crudo	25.01	694.93	0.036	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22.95	249.24	0.092	2.6	92
DEAE-sephacel	15.65	7.87	1.989	55.2	63
Sephacryl S-300	7.91	2.97	2.660	74.0	32

Una vez obtenido el extracto crudo, se procedió a concentrar la proteína mediante precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Al tratarse de una precipitación fraccionada se eliminó una gran cantidad de proteína sin que apenas se afectase la actividad NADH-GOGAT total, actividad que se recuperó entre el 30 y 60% de saturación, consiguiéndose de esta forma una actividad específica 2.6 veces superior.

La disolución concentrada de proteínas se pasó por una columna de DEAE-sephacel. En el perfil de elución (Fig. 3.1) podemos observar que el pico de mayor actividad eluye a 0.24 M de KCl. Entre las fracciones con actividad se seleccionaron aquellas que tenían menos proteína total, desde la 54 hasta la 65. Este es el paso de purificación en el que obtenemos mayor rendimiento (63%).

El concentrado del DEAE-sephacel se pasó por una columna de Sephacryl S-300. En el perfil de elución (Fig. 3.2), podemos comprobar que el pico de actividad aparece desplazado respecto al mayor pico de proteína, de esta forma eliminamos gran cantidad de proteínas de elevado peso molecular que podría interferir en la obtención de una banda de NADH-GOGAT separada del resto de la proteína en geles de poliacrilamida.

Los distintos pasos de purificación los tenemos en la figura 3.3. En la foto 3.2 se ve más claramente cómo la banda de NADH-GOGAT se encuentra la primera y totalmente



separada del resto de las proteínas, en una situación propicia para ser cortada y utilizada para la obtención de anticuerpos.

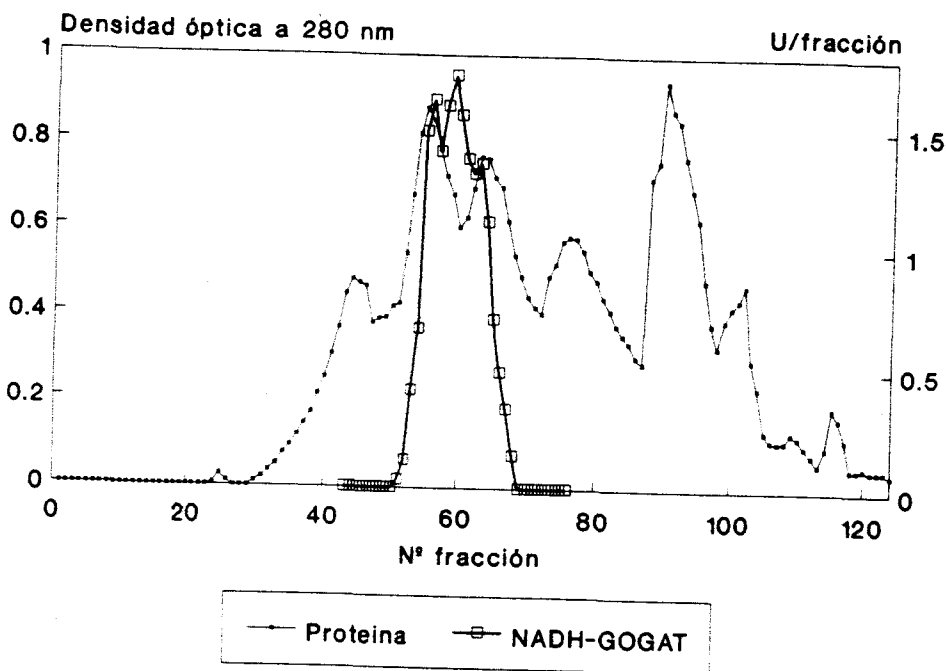


Figura 3.1. Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT, con gradiente de KCl (0.1-0.4 M), a través de una columna de DEAE-sephacell.

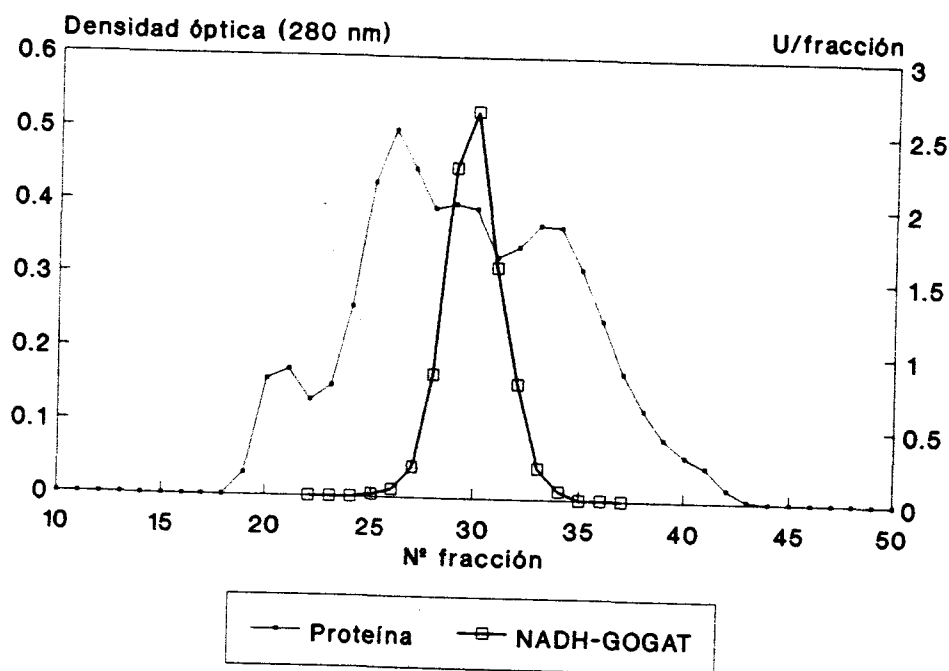


Figura 3.2. Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT cuando pasa por una columna de Sephacril S-300.

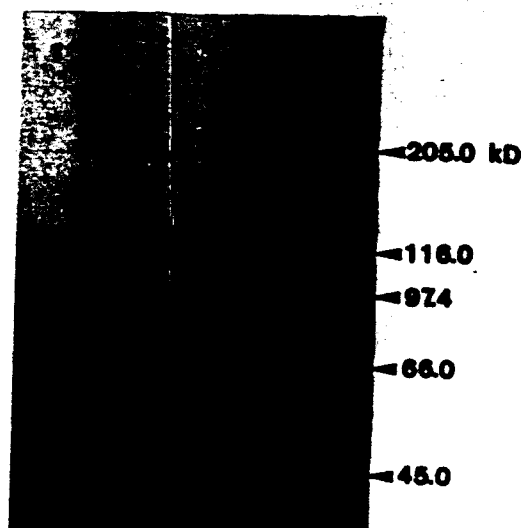


Figura 3.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de las distintas etapas de purificación; 1, extracto crudo, 23  $\mu$ g de proteína; 2, sulfato amónico, 25  $\mu$ g de proteína; 3, DEAE-sephacell, 25  $\mu$ g de proteína; 4, Sephacril S-300, 9.3  $\mu$ g de proteína; 5, marcadores del peso molecular: (1) miosina (205 kDa), (2)  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), (3) fosforilasa b (97.4 kDa), (4) seroalbúmina (66 kDa) y (5) ovoalbúmina (43 kDa).

### 3.2. Determinación de posibles isoformas de la NADH-GOGAT

La observación del pico de actividad en la elución por DEAE-sephacel (figura 3.1) nos hizo cuestionarnos a cerca de la existencia de dos isoenzimas de la NADH-GOGAT en nuestro material de trabajo. Para comprobarlo, el concentrado de proteínas obtenido por precipitación fraccionada con sulfato amónico se sometió a dos pasos consecutivos de intercambio iónico sobre geles de DEAE-sepharosa y Q-sepharosa (Figs 3.4 y 3.5). En ambas eluciones obtuvimos un solo pico de actividad NADH-GOGAT, que eluyó a 0.24 M de KCl para la DEAE-sepharosa y a 0.36 M de KCl para la Q-sepharosa.

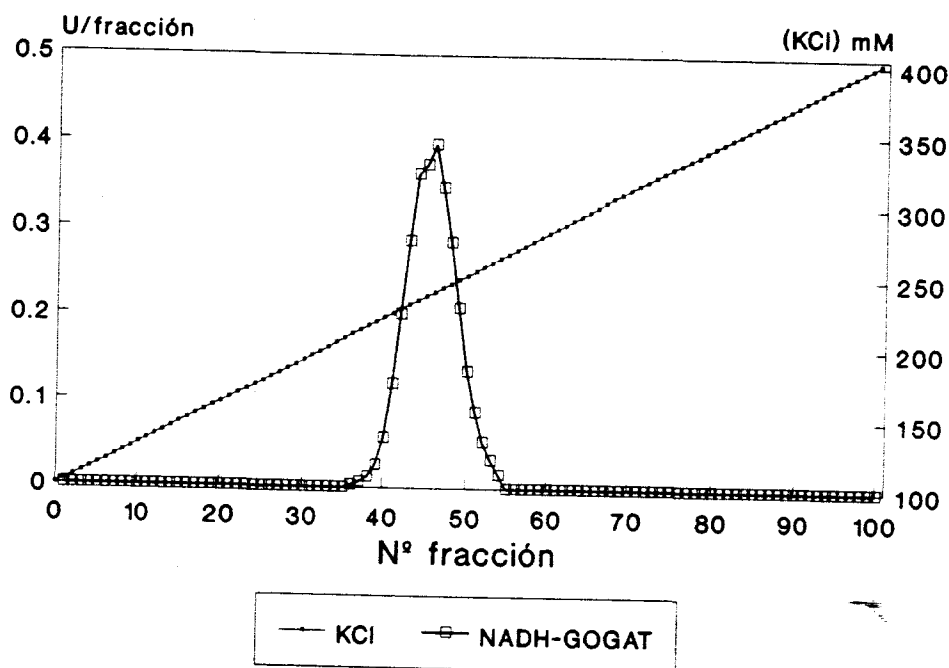


Figura 3.4. Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT, con gradiente de KCl (0.1-0.4 M), a través de una columna de DEAE-sepharosa.

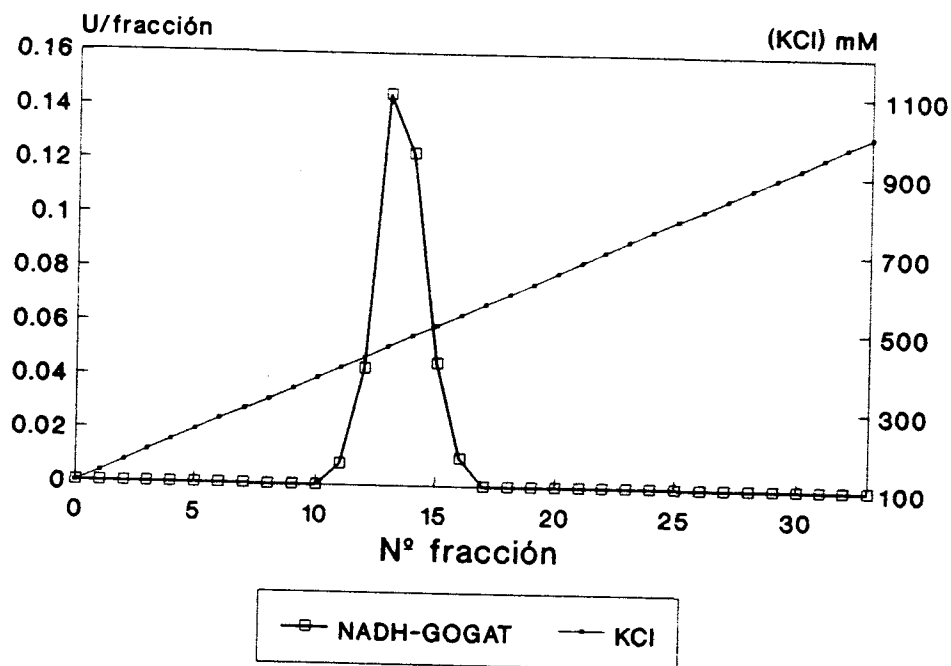


Figura 3.5. Perfil de elución de la actividad NADH-GOGAT, con gradiente de KCl (0.1-1 M), a través de una columna de Q-sepharosa.

### 3.3. Determinación del peso molecular de la subunidad de la NADH-GOGAT

Por electroforesis desnaturante en SDS-poliacrilamida de la preparación parcialmente purificada de la NADH-GOGAT, comprobamos que la enzima migra como una banda mayoritaria de proteína, con un peso molecular estimado de aproximadamente  $192 \pm 2$  kDa, según la recta de calibrado construida con los datos de movilidad electroforética de los marcadores (Fig. 3.6).

### 3.4. Determinación del peso molecular nativo de la NADH-GOGAT

El peso molecular nativo de la NADH-GOGAT se determinó por cromatografía de exclusión molecular y por electroforesis nativa en gradiente de poliácridamida. Mediante filtración en Sephacril S-300, el peso molecular resultó en torno a  $222 \pm 5$  kDa (Fig. 3.7). Al utilizar la electroforesis en gradiente de poliácridamida en tinciones por actividad, la estimación del peso molecular en base a la recta reconstruida fue algo mayor,  $236 \pm 3$  kDa (Fig. 3.8).

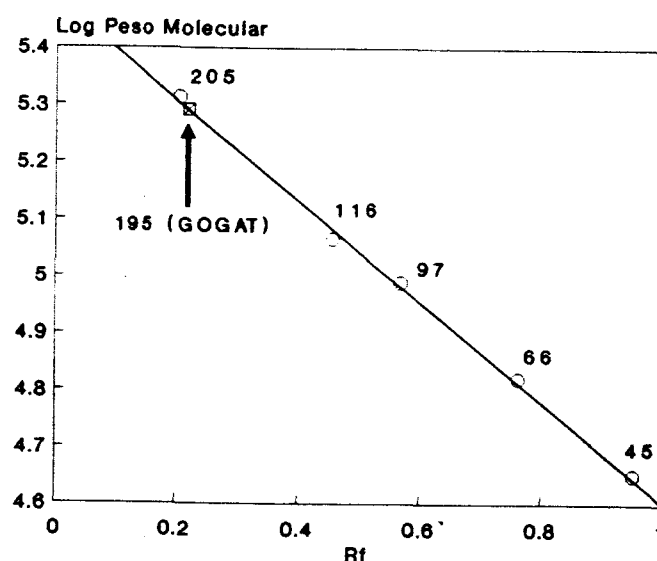


Figura 3.6. Determinación del peso molecular de la subunidad de la NADH-GOGAT mediante electroforesis desnaturante en gel de poliácridamida con SDS. Marcadores: (1) miosina (205 kDa), (2)  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), (3) fosforilasa b (97.5 kDa), (4) seroalbúmina (66 kDa) y (5) ovoalbúmina (43 kDa).

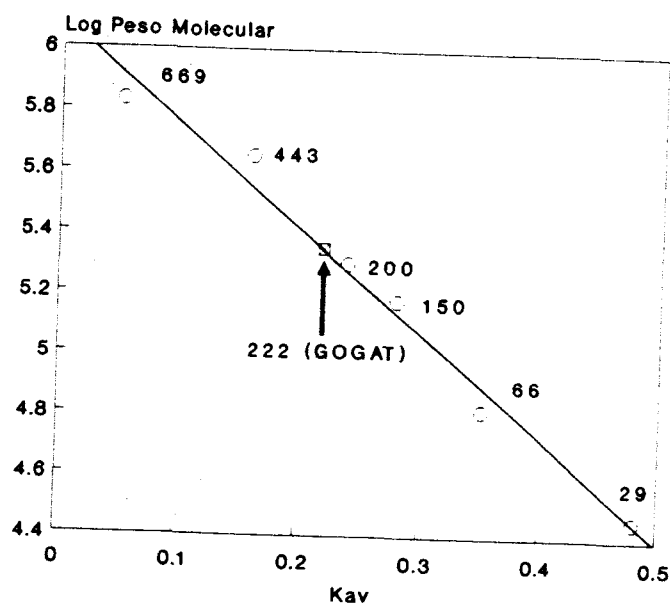


Figura 3.7. Determinación del peso molecular nativo de la NADH-GOGAT mediante filtración en Sephacril S-300. Marcadores: (1) tiroglobulina (669 kDa), (2) apoferritina (443 kDa), (3)  $\beta$ -amilasa (200 kDa), (4) alcohol deshidrogenasa (150 kDa), (5) seroalbúmina bovina (66 kDa) y (6) anhidrasa carbónica (29 kDa).

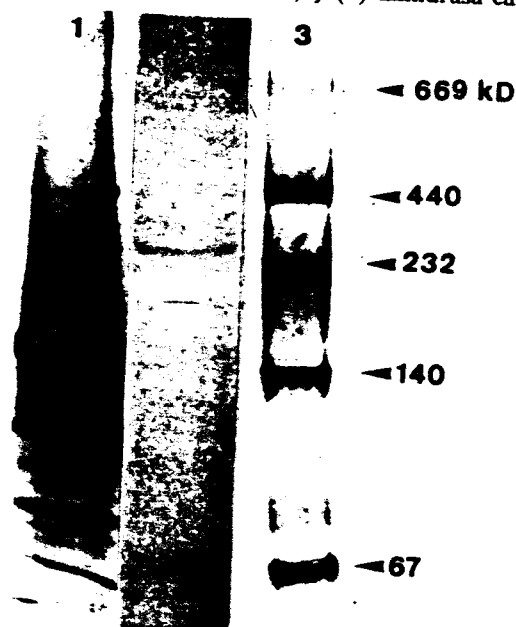


Figura 3.8. Electroforesis nativa de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* en gradiente de 4.5 a 10% de poliacrilamida. 1, extracto crudo (11,4  $\mu$ g de proteína), tinción por Coomassie; 2, preparación parcialmente purificada (25  $\mu$ g de proteína), tinción por actividad; 3, marcadores del peso molecular: (1) tiroglobulina (669 kDa), (2) ferritina (440 kDa), (3) catalasa (232 kDa), (4) lactato deshidrogenasa (140 kDa) y (5) albúmina bovina (67 kDa).

### 3.5. Estudio de la especificidad de los anticuerpos frente a la NADH-GOGAT

La especificidad de los anticuerpos obtenidos frente a la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* fue comprobada mediante "Western blot" de extractos crudos de nódulos sometidos a una SDS-PAGE, en el que se aprecia una única banda (Fig. 3.9) correspondiente a una proteína de un peso molecular de 195 kDa, siendo coincidente con el calculado para la preparación parcialmente purificada de la NADH-GOGAT.

En la figura 3.9 también comprobamos la presencia de la proteína NADH-GOGAT en extractos crudos de hojas, raíz y bacteroides, siendo sólo reconocida en raíz.

La curva de inmunotitulación de la actividad NADH-GOGAT (Fig. 3.10), se realizó con alícuotas de 100  $\mu$ l de extracto crudo que se incubaron con cantidades crecientes de antisuero y PBS hasta un volumen final de 0.4 ml, durante 12 h a 4°C. Para precipitar los inmunocomplejos se adicionó Proteína A-sepharosa (10  $\mu$ g) a cada reacción. Tras centrifugar se ensayó la actividad del sobrenadante. Con 20  $\mu$ l de suero se produce una inhibición de la actividad del 60% y con 40  $\mu$ l desaparece toda la actividad residual de NADH-GOGAT en el sobrenadante.

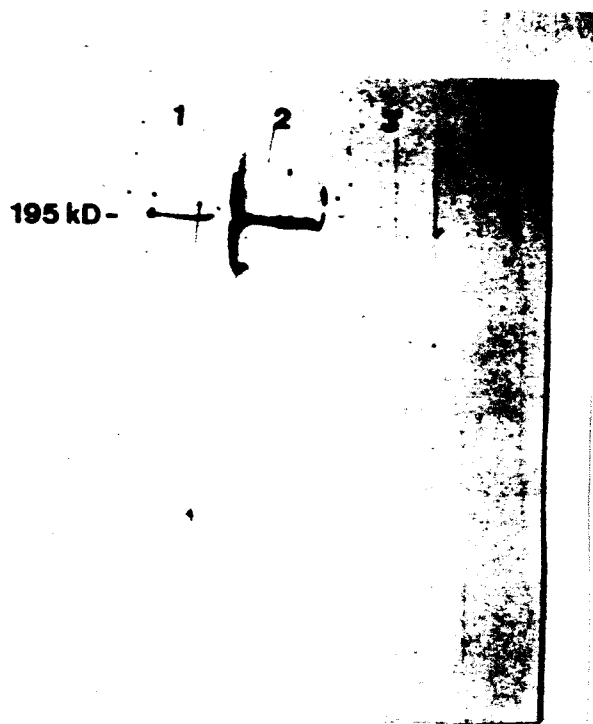


Figura 3.9. Western blot de proteínas solubles de *V. faba*: 1, raíz; 2, nódulos efectivos; 3, bacteroides y 4, hojas, revelado con suero frente a la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*. Se utilizaron 25  $\mu$ g de proteína en cada pocillo.

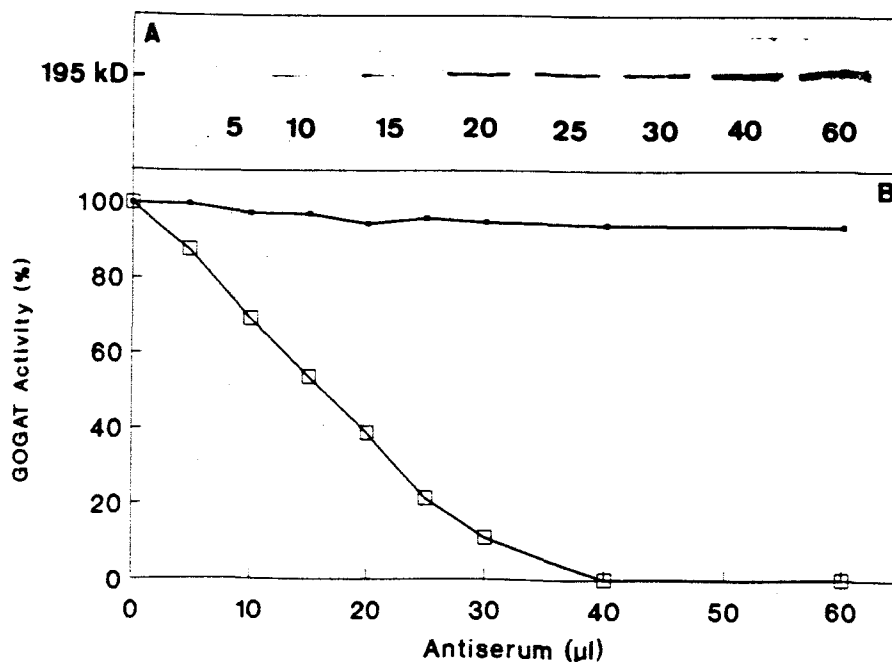


Figura 3.10. Inmutitulación de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*. A. "Western blot" de los inmunocomplejos. B. Curva de la inmunotitulación de la actividad NADH-GOGAT.

#### 4. EVOLUCIÓN EN EL FOTOPERIODO DEL CICLO DE LA GLUTAMATO SINTASA EN NÓDULOS FIJADORES DE DINITRÓGENO DE *Vicia faba*

Este experimento se planteó a los 23 días de crecimiento de plantas de *V. faba cv.* Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*, momento en que la actividad ARA específica de nódulos (Fig. 2.5) presenta menos pendiente y en que las actividades NADH-GOGAT y GS se encuentran en fase estacionaria de máxima actividad (Fig. 2.6).

El estudio de las actividades ARA específica, GS, NADH-GOGAT y NADH-GDH a lo largo de dos períodos de luz y oscuridad consecutivos se planteó para estudiar la relación que pudiera existir entre la luz y estas actividades.

#### 4.1. Actividad nitrogenasa

Los resultados obtenidos para la actividad ARA específica (Fig. 4.1) mostraron, dos picos de máxima actividad que coincidieron entre las 4 y 7 h del período de luz y que presentaron diferencias significativas respecto a las demás medidas realizadas tanto en luz como en oscuridad, obteniéndose un perfil de actividad dependiente de la presencia de luz. Dado que a lo largo de 48 h no se detectan diferencias en la masa nodular, la actividad ARA. (planta)<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, daría un perfil idéntico al de la figura 4.1.

#### 3.2. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

Las actividades NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Fig. 4.2), mostraron un comportamiento análogo con ciclos de 16 h que se sucedieron tanto en luz como en oscuridad, alcanzando el máximo en ambos períodos. La actividad NADH-GDH también presentó un comportamiento cíclico cada 16 h, con puntos máximos que coincidieron con los de la NADH-GOGAT y por tanto con los de la GS, pero sus valores fueron muy bajos, se movieron entre 22 y 37  $\mu\text{mol de NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

**Tabla 4.1.** Evolución en el fotoperíodo del contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$  de nódulos de plantas de *Vicia faba* L. cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*.

Horas	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$	Horas	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$	Horas	$\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$
0	12.53	19	12.67	37	12.43
4	12.31	22	12.07	40	11.40
7	12.57	24	12.12	43	11.04
10	11.75	28	11.55	46	11.12
13	<u>11.87</u>	<u>31</u>	<u>11.74</u>	<u>48</u>	<u>11.16</u>
16	12.21	34	12.28		
MDS (0.05)			1.13		



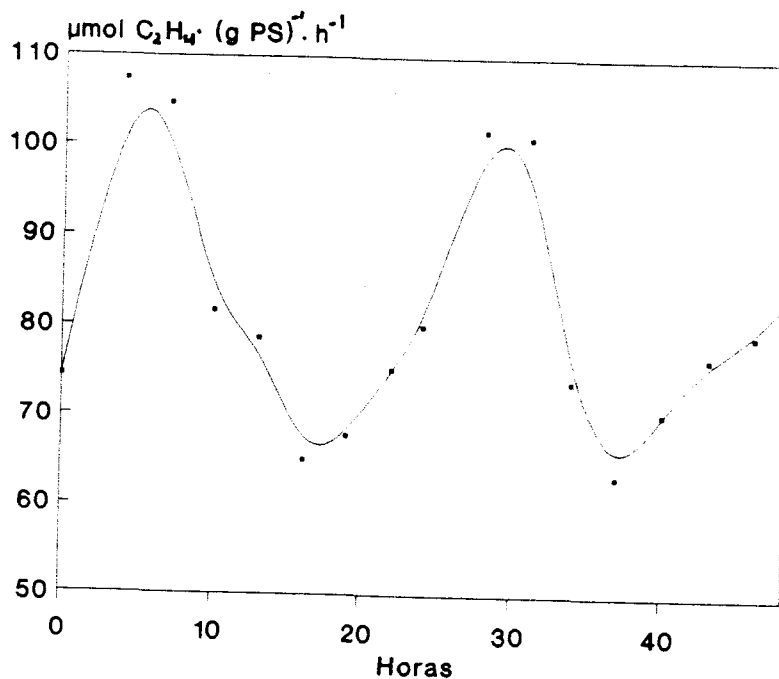


Figura 4.1. Evolución en el fotoperíodo de la actividad reductora de acetileno expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

Los datos de proteína (Tab. 4.1) no presentaron diferencias a lo largo de las 48 h de ensayo, por lo que las diferencias en actividad enzimática a lo largo del tiempo se deben al reloj biológico de las enzimas. También puede deberse a la presencia de moléculas moduladoras de esta actividad. Una alta actividad enzimática no puede mantenerse durante períodos prolongados porque acabaría con todo el sustrato y se acumularía mucho producto, por eso debe inhibirse por determinados moduladores.

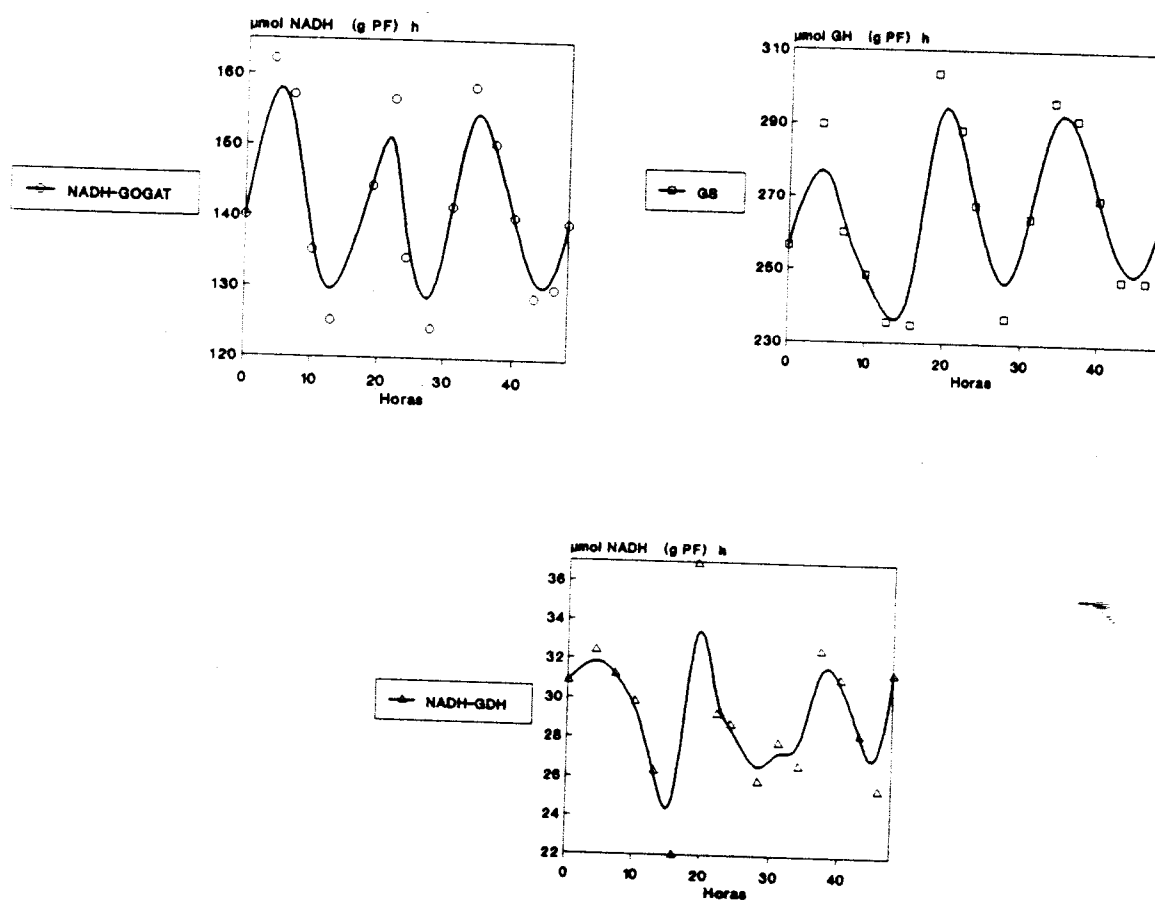


Figura 4.2. Evolución en el fotoperiodo de las actividades enzimáticas, NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol} \cdot \text{NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (a), GS, expresada en  $\mu\text{mol} \cdot \text{GH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (b), y NADH-GDH, expresada en  $\mu\text{mol} \cdot \text{NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (c), de nódulos de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. (a) MDS (0.05) = 6.24, (b) MDS (0.05) = 9.38, (c) MDS (0.05) = 1.07

## 5. EFECTO DEL CLORURO DE SODIO EN LA SIMBIOSIS DE *V. faba*: APLICACION EN EL MOMENTO DE LA INOCULACION

El crecimiento, de plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, a distintas concentraciones de NaCl nos permitió estudiar cómo se afecta el establecimiento de la simbiosis y su posterior desarrollo, así como las consecuencias que se dejan notar en el crecimiento de la planta. Estos resultados nos sirvieron para concluir a cerca de la mayor concentración de NaCl que no afecta, de forma significativa, a la simbiosis en estas condiciones de crecimiento.

### 5.1. Crecimiento y nodulación

El peso seco total (Fig. 5.1) de plantas que crecen desde el inicio con NaCl presentan una fuente de varibilidad compartida entre el tratamiento salino y el tiempo de cultivo, con un efecto del 52% ( $P \leq 0.001$ ) y 40% ( $P \leq 0.001$ ), respectivamente. Entre los tratamientos de 75 y 100 mM de NaCl no aparecen variaciones (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). Los valores obtenidos, para todas las concentraciones ensayadas de NaCl, se apartan significativamente de los valores obtenidos para el control. Entre 50 mM de NaCl y concentraciones mayores sólo aparecen diferencias significativas en la última recogida.

Estos datos se completan con los valores de TCR calculados entre medias (Tab. 5.1). En ellos se puede observar cómo aún cuando en las plantas control se incrementa dos veces la velocidad de crecimiento, en las plantas tratadas disminuye conforme aumenta la concentración de NaCl.

Otro parámetro relacionado con el crecimiento es la relación R/PA cuyos resultados se muestran en la tabla 5.2. En este caso sólo el tratamiento con NaCl tuvo un efecto significativo, siendo responsable del 78% ( $P \leq 0.05$ ) de la varibilidad observada. Por lo general la presencia de NaCl en el medio de crecimiento hizo que aumentara, en torno a 0.5, de forma significativa esta relación a lo largo de las 3 recogidas realizadas para las plantas tratadas, sin embargo no aparecieron variaciones entre las distintas concentraciones de NaCl ensayadas (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ).

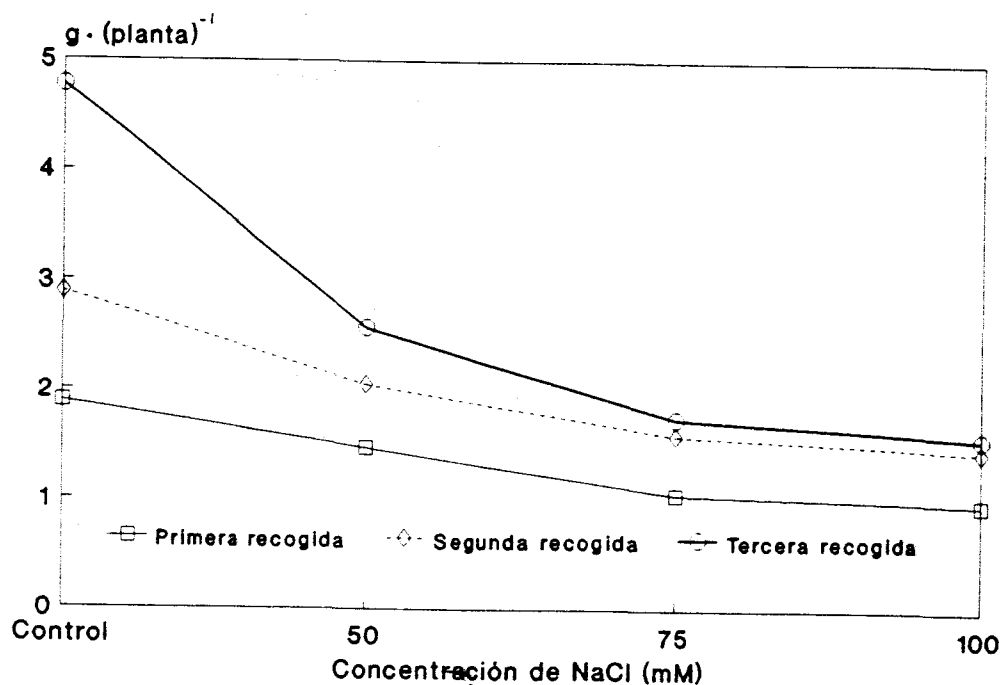


Figura 5.1. Acumulación de materia seca, expresada en  $\text{g. (planta)}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* crecidas desde la siembra con distintas concentraciones de NaCl, 50, 75 y 100 mM. Se realizaron recogidas cada 7 días desde los 28 hasta los 50 días. Plantas crecidas sin NaCl sirvieron como control. MDS (0.05) = 0.50

Tabla 5.1. Tasa de crecimiento relativo, expresada en  $\text{mg PS. (planta)}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, crecidas desde el inicio del cultivo a distintas concentraciones de NaCl, 50, 75 y 100 mM. Plantas crecidas sin NaCl sirvieron como control.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	0	50	75	100
Segunda	0.143	0.083	0.076	0.070
Tercera	0.269	0.072	0.021	0.016

Tabla 5.2. Relación R/PA de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* crecidas desde el inicio del cultivo a distintas concentraciones de NaCl, 50, 75 y 100 mM. Se realizaron recogidas a los 28, 35 y 42 días. Plantas crecidas sin NaCl sirvieron como control.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	Control	50	75	100
Primera	0.40	0.57	0.50	0.51
Segunda	0.38	0.52	0.43	0.52
Tercera	0.40	0.55	0.53	0.53
MDS (0.05)		0.08		

La disminución en el crecimiento de la planta se hace patente visualmente, por un descenso de la longitud de los entrenudos, mucho más acentuada cuanto mayor es la concentración de NaCl y por una disminución del tamaño de las hojas que además se amarillean (Figura 4.2).

Figura 4.2. Aspecto de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* crecidas desde el inicio del cultivo con distintas concentraciones de NaCl, 50, 75 y 100 mM. Plantas crecidas sin NaCl sirvieron como control. La fotografía fue realizada a los 28 días de crecimiento.

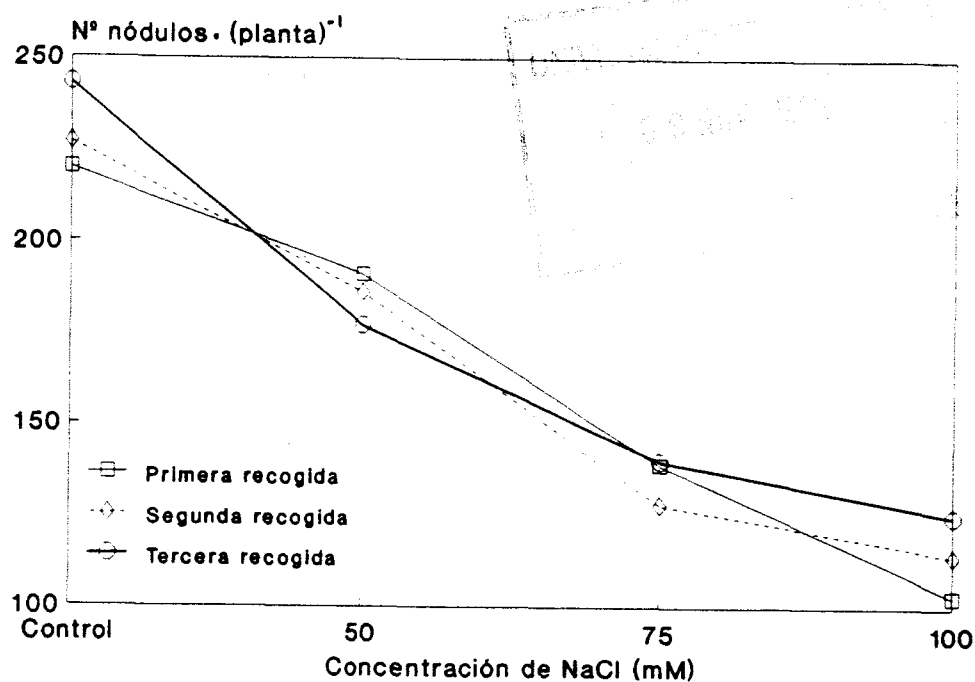
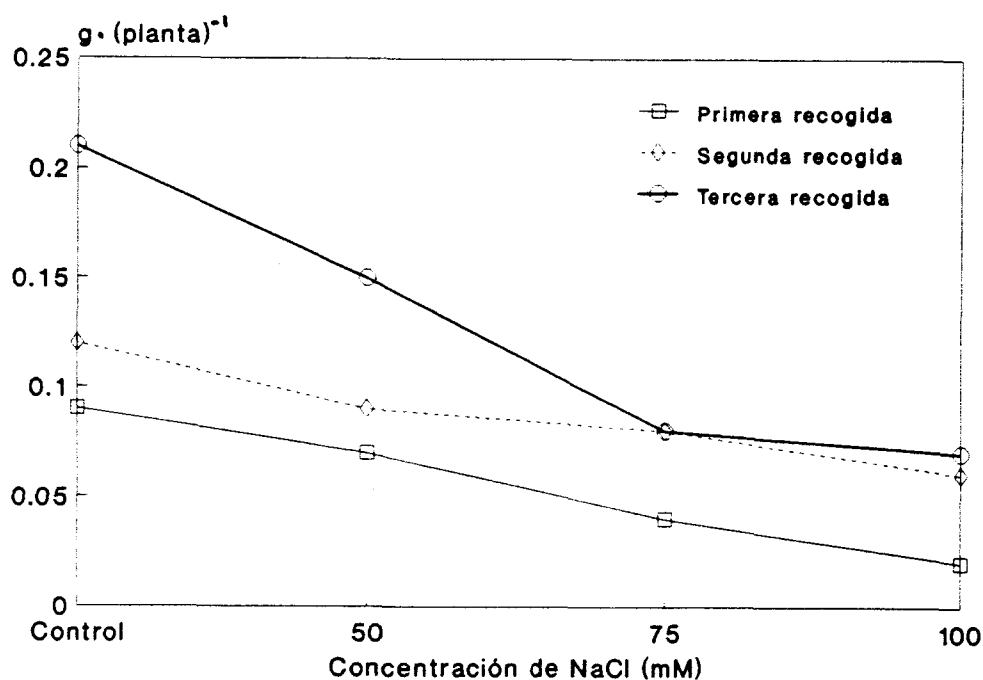


Figura 5.3. Número de nódulos por planta de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y tratadas desde la siembra con distintas concentraciones de NaCl, 50, 75 y 100 mM. Plantas crecidas sin NaCl sirvieron como control. MDS (0.05) = 57.23

El número de nódulos por planta (Figura 5.3) aparece fundamentalmente condicionado por el tratamiento con NaCl, con un efecto sobre la variabilidad observada del 93% ( $P \leq 0.001$ ). Todas las concentraciones de NaCl se alejan de forma significativa del control (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). Para 50 mM de NaCl la inhibición en el número de nódulos por planta es alrededor del 20%, del 36% para 75 mM y del 52% para 100 mM de NaCl, inhibición que se hace patente en la primera recogida independientemente del tiempo (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ).

En el crecimiento de los nódulos (Figura 5.4), tubo un efecto significativo el tiempo de crecimiento, siendo responsable del 52% ( $P \leq 0.001$ ) de la variabilidad observada, aunque también se afectó por la concentración de NaCl con un 41% ( $P \leq 0.001$ ) de efecto. Las plantas que crecieron a 75 y 100 mM de NaCl presentaron un comportamiento muy parecido (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ), sin que halla variaciones entre ambas concentraciones. Respecto al control todas las concentraciones de NaCl ensayadas presentaron diferencias significativas,

con una inhibición en la masa nodular proporcional a la concentración de NaCl ensayada.



**Figura 5.4.** Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre el peso seco de nódulos, expresado en  $g \cdot (planta)^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 0.04

## 5.2. Actividad nitrogenasa

En la Figura 5.5 se exponen los resultados de actividad nitrogenasa específica de las plantas tratadas con distintas concentraciones de NaCl, valorada mediante el test de reducción de acetileno. La aplicación de NaCl al medio de crecimiento provocó una inhibición de la ARA que se hace significativa ya a 50 mM de NaCl. Entre tratamientos no aparecen diferencias significativas (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ).

En este caso el tiempo es un fuente de variación con un efecto del 55% ( $P \leq 0.001$ ) frente a la concentración de NaCl que supone un 42% ( $P \leq 0.05$ ). Esto es comprensible si tenemos en cuenta que la ARA específica cambia mucho con el tiempo de cultivo.

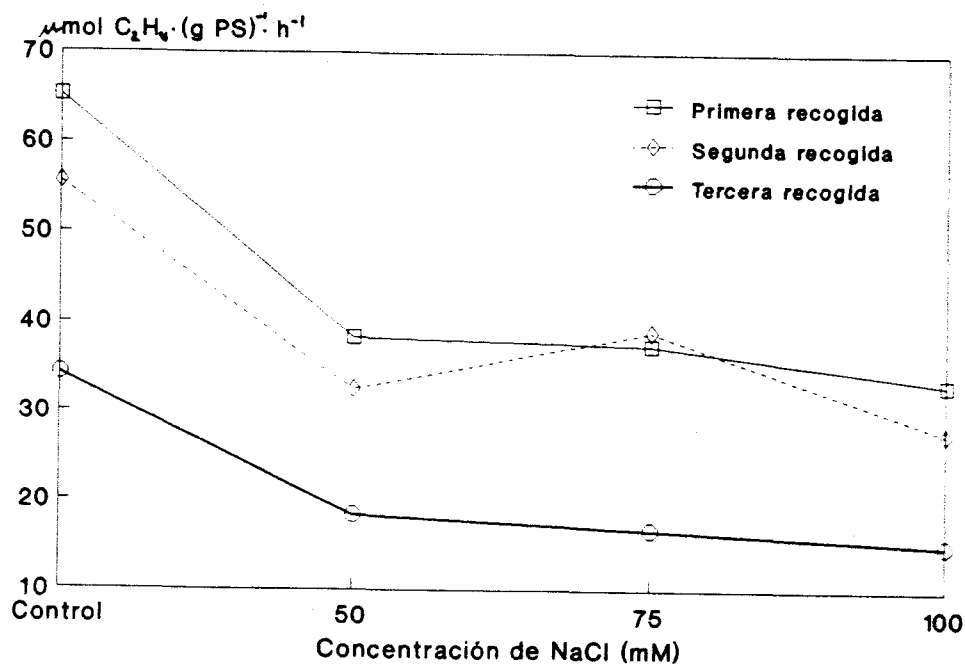


Figura 5.5. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 11.74

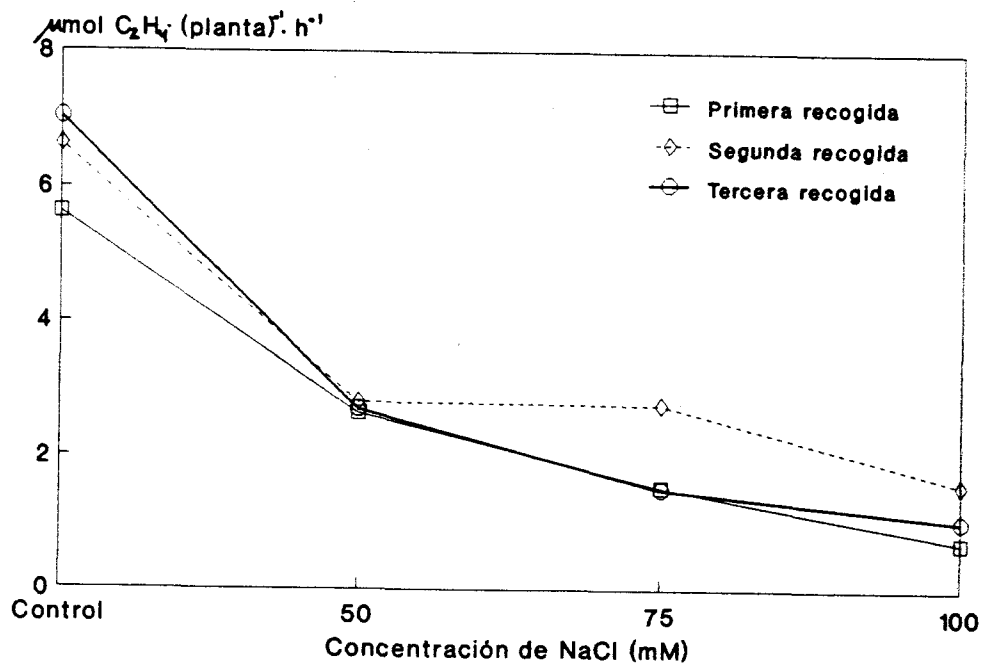


Figura 5.6. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 1.05



Cuando los resultados se expresan en ARA por planta (Fig. 5.6) la principal fuente de variación se debió al tratamiento con NaCl, con un efecto de un 94% ( $P \leq 0.001$ ). Se observa una inhibición de la actividad (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ) tanto mayor cuanto mayor es la concentración de NaCl adicionada. En las plantas tratadas aparecen diferencias significativas entre valores altos de NaCl (100 mM) y valores medios (50 mM). Los valores para todos los tratamientos salinos distan de los obtenidos para el control.

#### 4.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

En la segunda recogida, 35 días de crecimiento, se llevó a cabo la determinación de las actividades enzimáticas GS y NADH-GOGAT (Tab. 4.3), en este momento ambas actividades se encuentran en su máximo de actividad. La actividad GS se inhibió significativamente en las plantas tratadas. Para 50 y 75 mM de NaCl la inhibición fue parecida, de un 22% aproximadamente (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ), siendo de un 57% para 100 mM de NaCl. La actividad NADH-GOGAT se inhibió un 71% en plantas que crecieron a 100 mM de NaCl. En este caso el porcentaje de inhibición fue mayor cuanto mayor fue la concentración de NaCl ensayada apareciendo diferencias significativas en todos los niveles de NaCl ensayados (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). En la misma tabla se exponen los valores de proteína, entre 50 y 75 mM de NaCl no aparecen diferencias significativas, sí entre las plantas tratadas y el control (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). Para 100 mM de NaCl hay una inhibición del 33% en proteína soluble.

Tabla 5.3. Actividades glutamina sintasa, glutamato sintasa y contenido en proteína soluble expresados en,  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ , respectivamente, de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* y crecidas durante 35 días con distintas concentraciones de NaCl en el medio de crecimiento. Plantas crecidas sin NaCl sirvieron como control.

Parámetro	Concentración de NaCl (mM)				MDS (0.05)
	Control	50	75	100	
GS	124.35	84.52	64.92	36.13	3.57
GOGAT	316.42	250.00	246.14	135.58	5.27
Proteína	11.66	9.20	9.05	7.80	0.78

## 6. EFECTO DEL CLORURO DE SODIO APLICADO A SIMBIOSIS YA ESTABLECIDAS Y FIJADORAS DE DINITRÓGENO

Con este experimento estudiamos los efectos de la aplicación de NaCl sobre nódulos efectivos, perfectamente formados y fijadores de N<sub>2</sub>.

### 6.1. Crecimiento y nodulación

A diferencia del experimento anterior, en el crecimiento de la planta (Fig. 6.1) la principal fuente de variación fue el tiempo de cultivo, con un efecto del 74.25% ( $P \leq 0.001$ ), en la primera recogida ninguna de las concentraciones de NaCl ensayadas inhibió el peso seco total, en la segunda recogida esta inhibición se hace significativa para 75 y 100 mM de NaCl y para 50 mM, sólo, en la última recogida.

En la tabla 6.1 tenemos la TCR, en la que podemos ver cómo la velocidad de crecimiento disminuye conforme ambos parámetros, tiempo y concentración de NaCl, aumentan, llegando hasta encontrarse valores de 0.006 para 100 mM en la última recogida.

**Tabla 6.1.** Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la tasa de crecimiento relativo, expresado en mg PS · (planta)<sup>-1</sup> · día<sup>-1</sup>, de plantas de *Vicia faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	Control	50	75	100
Primera	0.148	0.123	0.129	0.104
Segunda	0.291	0.263	0.147	0.157
Tercera	0.146	0.031	0.014	0.006

Otro parámetro relacionado con el crecimiento es la relación raíz/parte aérea (Tab. 6.2). La relación en peso seco de raíz/parte aérea se vió afectada de forma significativa por la concentración de NaCl a la que crecieron las plantas, siendo responsable de un 64% ( $P \leq 0.05$ ) de la variabilidad observada. No aparecen variaciones entre las concentraciones de NaCl ensayadas (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ), si bien en función del tiempo se hacen significativas las diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre 50 mM de NaCl y concentraciones mayores.

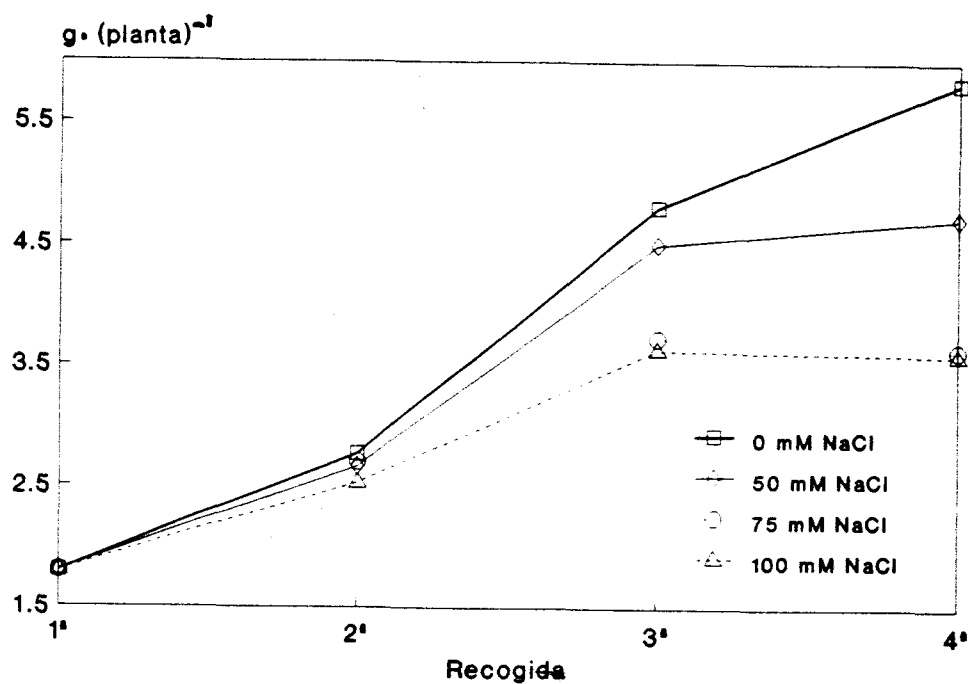


Figura 6.1. Efecto de distintas concentraciones de NaCl, aplicado sobre plantas fijadoras de nitrógeno, sobre la acumulación de materia seca, expresada en  $g \cdot (planta)^{-1}$ , de plantas de *V. faba* cv. Alborea inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 0.98

Tabla 6.2. Efecto de distintas concentraciones de NaCl aplicado sobre plantas fijadoras de NaCl sobre la relación en peso seco de raíz/parte aérea de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 0.08

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	Control	50	75	100
Primera	0.44	-	-	-
Segunda	0.39	0.48	0.46	0.49
Tercera	0.37	0.49	0.44	0.49
Cuarta	0.30	0.39	0.50	0.43
MDS (0.05)		0.08		

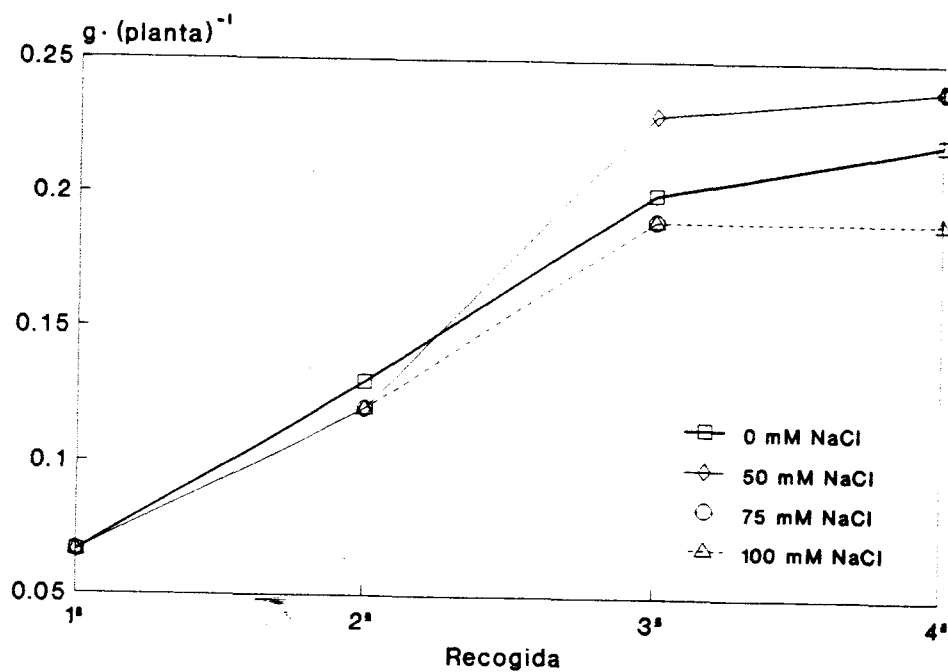


Figura 6.2. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre el peso seco de nódulos, expresado en  $g \cdot (planta)^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 0.06

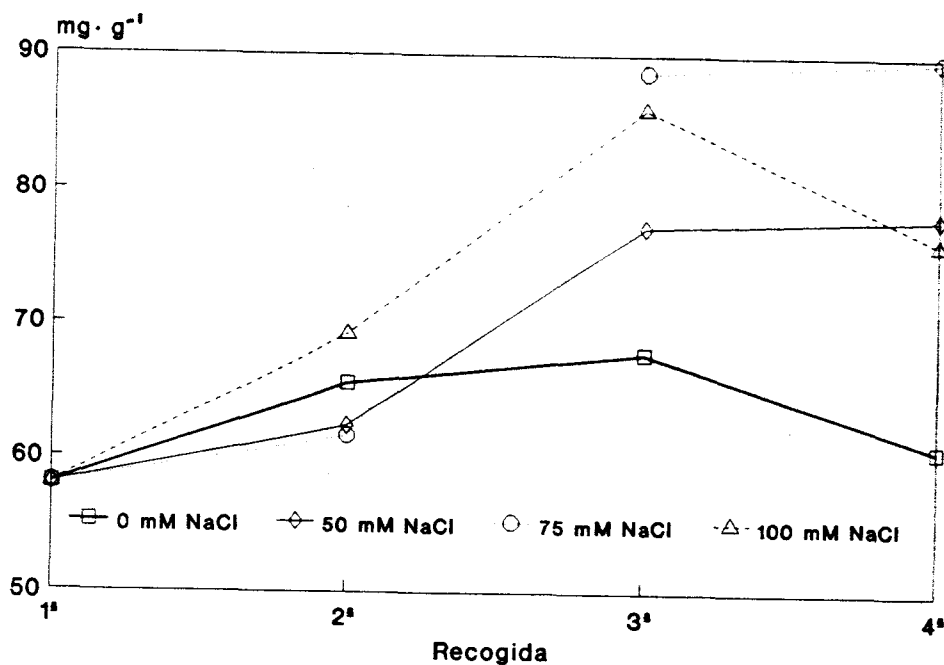


Figura 6.3. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre el peso normalizado de nódulos, expresado en  $mg \cdot (g \text{ PS})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 13.60

El peso seco de nódulos (Fig. 6.2) se afectó íntegramente en un 89% por el tiempo de contacto con el NaCl ( $P \leq 0.001$ ). No se encontraron diferencias entre tratamientos (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). Para 75 y 100 mM de NaCl las diferencias respecto al control se hacen significativas en las dos últimas recogidas, para 50 mM de NaCl en ninguna de ellas.

Para estudiar la posible incidencia de ciertos factores sobre el crecimiento de los nódulos se calculó su peso normalizado (Fig. 6.3), apreciándose que la variabilidad detectada se debió al tiempo de contacto con NaCl, con un efecto del 54.36%, aunque el tratamiento produjo un efecto del 28.89% ( $P \leq 0.001$ ). Entre el control y 50 mM de NaCl no aparecen diferencias significativas, sí entre el control y las concentraciones de 75 y 100 mM de NaCl, no entre 50 mM y concentraciones mayores.

## 6.2. Actividad nitrogenasa

La actividad ARA específica (Fig. 6.4) se vió fuertemente inhibida en las plantas tratadas sin que aparecieran variaciones entre concentraciones de NaCl (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). La principal fuente de variación fue la concentración de NaCl con un efecto del 67.14% ( $P \leq 0.05$ ) ya que desde el primer momento se crea una inhibición que se mantiene hasta el final del experimento.

La actividad ARA por planta (Fig. 6.5), la fuente de variabilidad fue la concentración de NaCl, con un efecto del 96.63% ( $P \leq 0.001$ ), ya que desde el primer momento se inhibe y se mantiene en estos valores mínimos hasta el final del muestreo. No aparecen variaciones entre tratamientos (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ), sino que se produce una inhibición idéntica entre concentraciones con una disminución de la actividad en torno al 57%.

## 6.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

La actividad GS (Figura 6.6) se inhibió fuertemente desde el primer momento de la aplicación del NaCl, siendo la principal fuente de variación la concentración de NaCl, con un efecto del 73.64% ( $P \leq 0.001$ ) y en función del tiempo de contacto con la sal, con un efecto del 19.25% ( $P \leq 0.001$ ). Entre 75 y 100 mM de NaCl no aparecen variaciones (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ).

La actividad NADH-GOGAT (Fig. 6.7) también se inhibió fuertemente desde la aplicación del NaCl, con un efecto del 56.64% ( $P \leq 0.001$ ), aunque disminuyó con el tiempo de contacto, suponiendo un efecto del 30.70% ( $P \leq 0.001$ ). Entre 50 y 75 mM de NaCl no aparecen variaciones (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ).

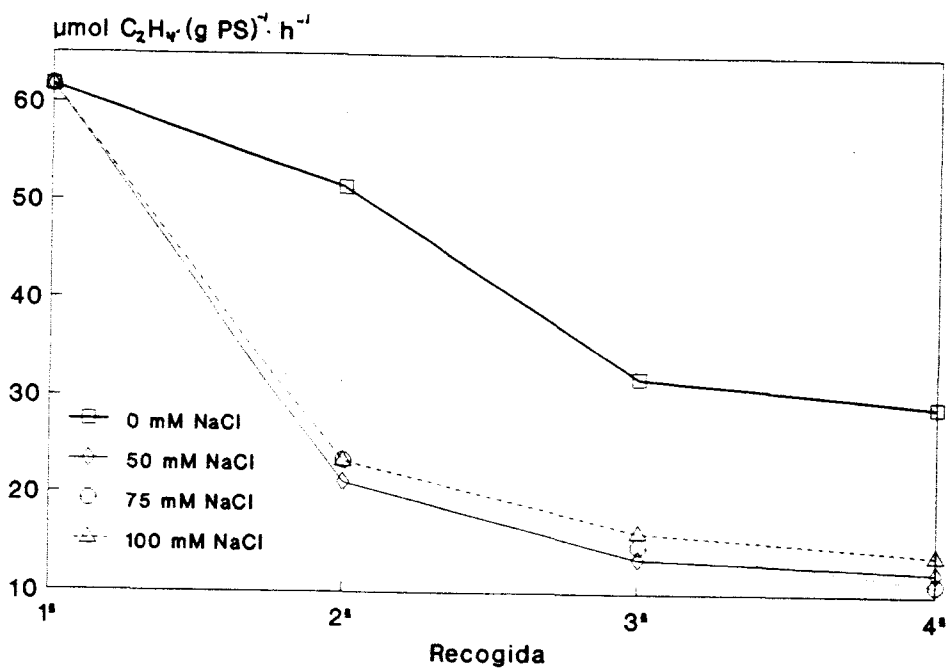


Figura 6.4. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 5.81

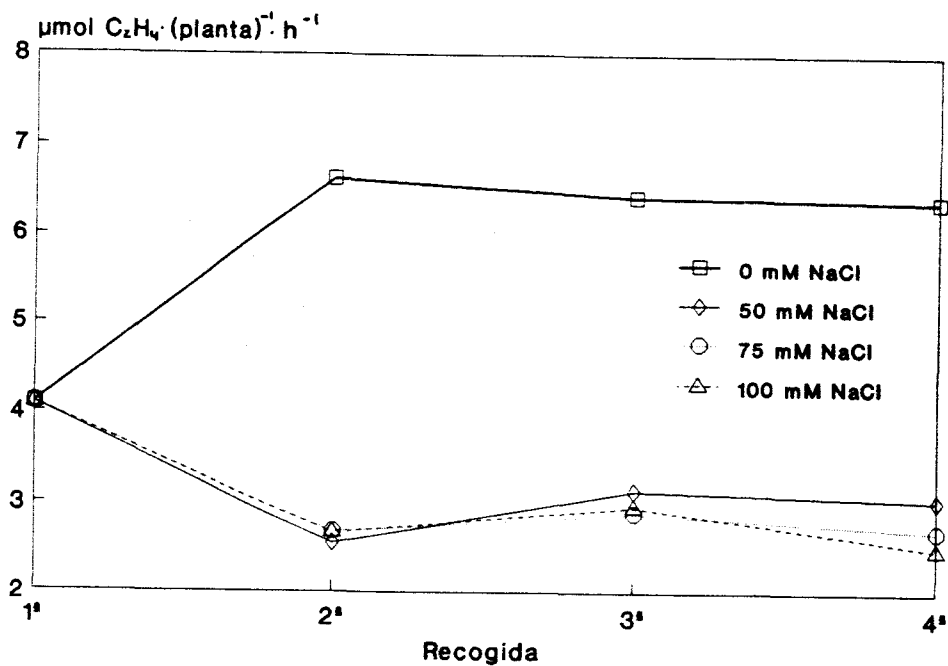


Figura 6.5. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 1.48

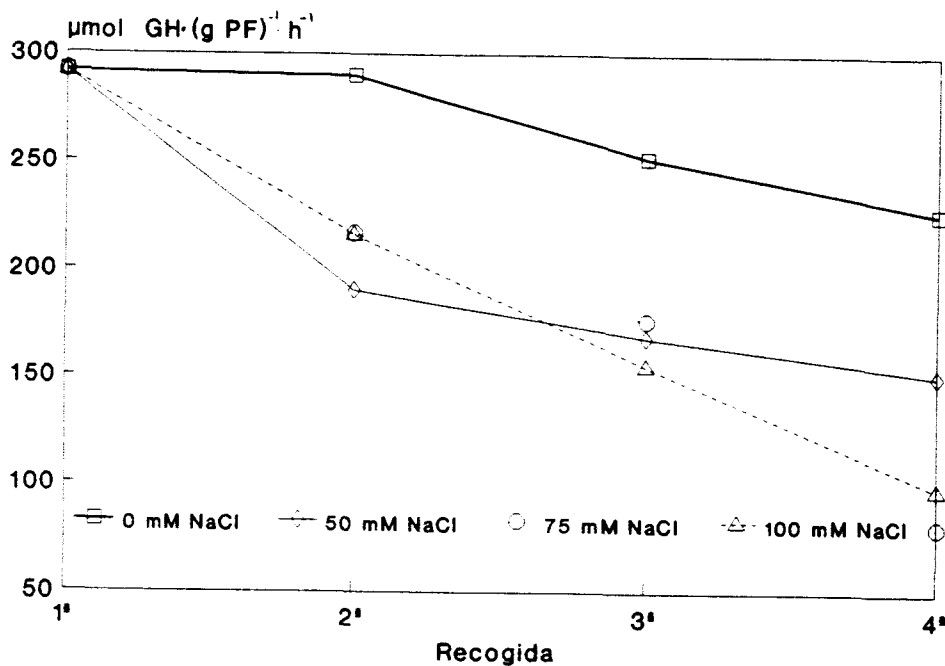


Figura 6.6. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad GS, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 10.03

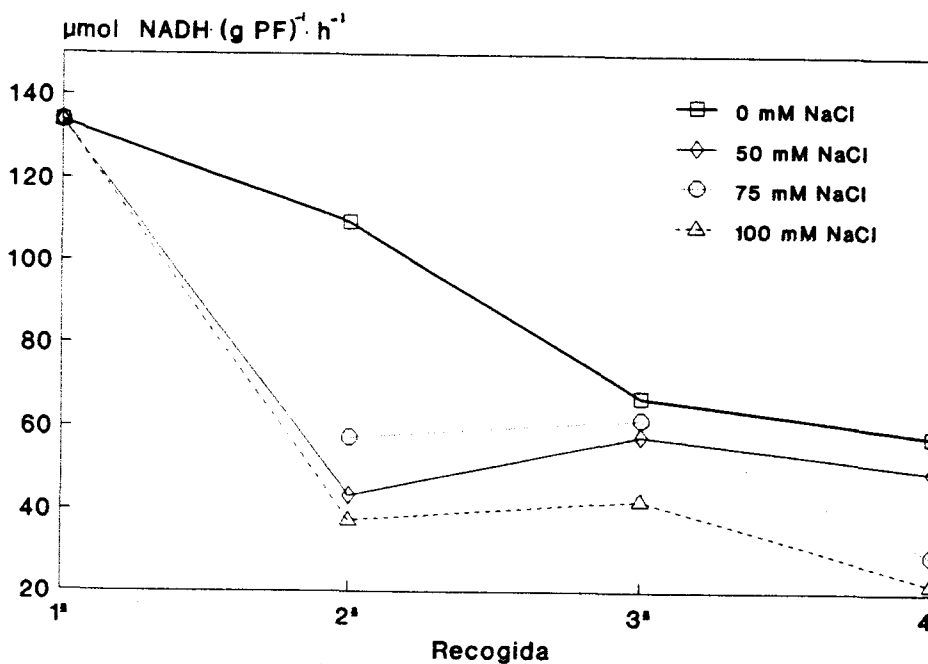


Figura 6.7. Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad NADH-GOGAT, expresada en  $\mu\text{mol NADH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. MDS (0.05) = 1.95

La cantidad de proteína soluble (Tab. 6.3), la principal fuente de variación fue el tiempo de contacto con NaCl, con un efecto del 59.83% ( $P \leq 0.001$ ), frente al efecto de la concentración de NaCl, 28.85% ( $P \leq 0.001$ ). No aparecen variaciones entre tratamientos (test de Tuckey,  $P \leq 0.05$ ). Aparecen diferencias significativas ya desde 50 mM de NaCl.

**Tabla 6.3.** Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre el contenido en proteína soluble, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$ , de plantas de *V. faba* inoculadas con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*.

Recogida	Concentración de NaCl (mM)			
	Control	50	75	100
Primera	12.88	-	-	-
Segunda	12.70	10.62	10.80	9.66
Tercera	10.85	9.14	10.36	10.14
Cuarta	10.65	9.00	6.20	6.88
MDS (0.05)		1.64		

## 7. TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN *V. faba*: UTILIZACIÓN DE LÍNEAS PURAS

Este experimento se planteó para estudiar la influencia del genotipo y variabilidad en la sensibilidad al NaCl en plantas de *V. faba* inoculadas con la cepa GRA19 de *Rhizobium leguminosarum*.

### 7.1. Crecimiento y nodulación

En todos los genotipos ensayados se produjo una inhibición de la acumulación de materia seca en las plantas tratadas con 75 mM de NaCl (Fig. 7.1). Este parámetro se vio fundamentalmente condicionado por la presencia de NaCl en el medio de crecimiento, con un efecto significativo que supuso un 87.87% ( $P \leq 0.05$ ) de la variabilidad encontrada. Destacan los genotipos VF16 y VF60, con una inhibición aproximada del 75%; VF64 sólo se inhibió un 18%. El resto de los genotipos inhibieron su crecimiento entre un 40 y un 50%.

La tasa de crecimiento absoluto (Fig. 7.2) se afectó igualmente, para todos los



genotipos, por el tratamiento salino un 93.21% ( $P \leq 0.05$ ), siendo los genotipos VF16 y VF60 los más inhibidos. Destaca igualmente VF60 por su resistencia (un 18% de inhibición).

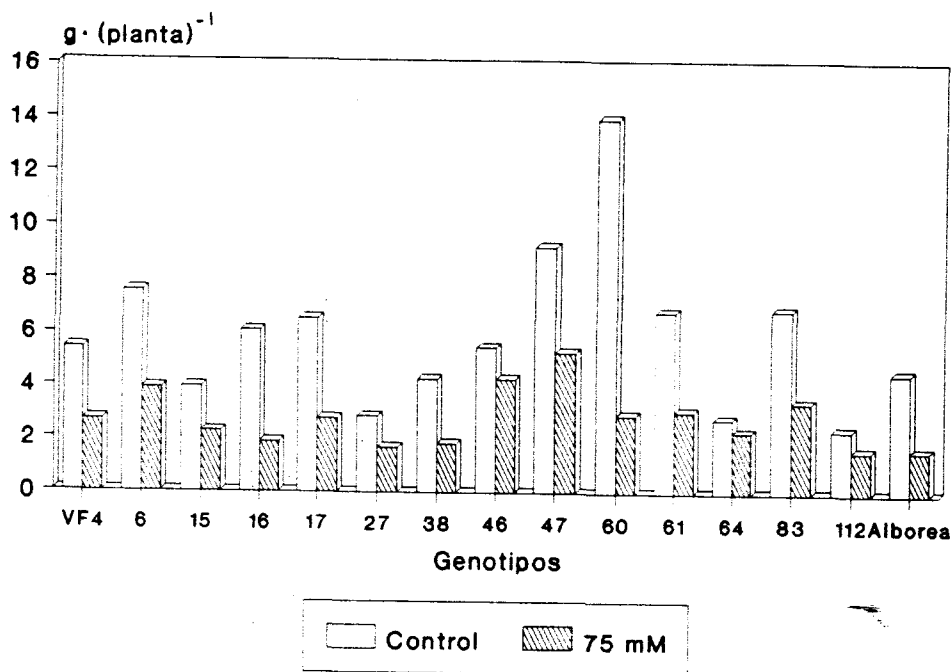


Figura 7.1. Efecto del NaCl (75mM) sobre la acumulación de materia seca, expresada en  $g \text{ PS} \cdot (\text{planta})^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 0.75

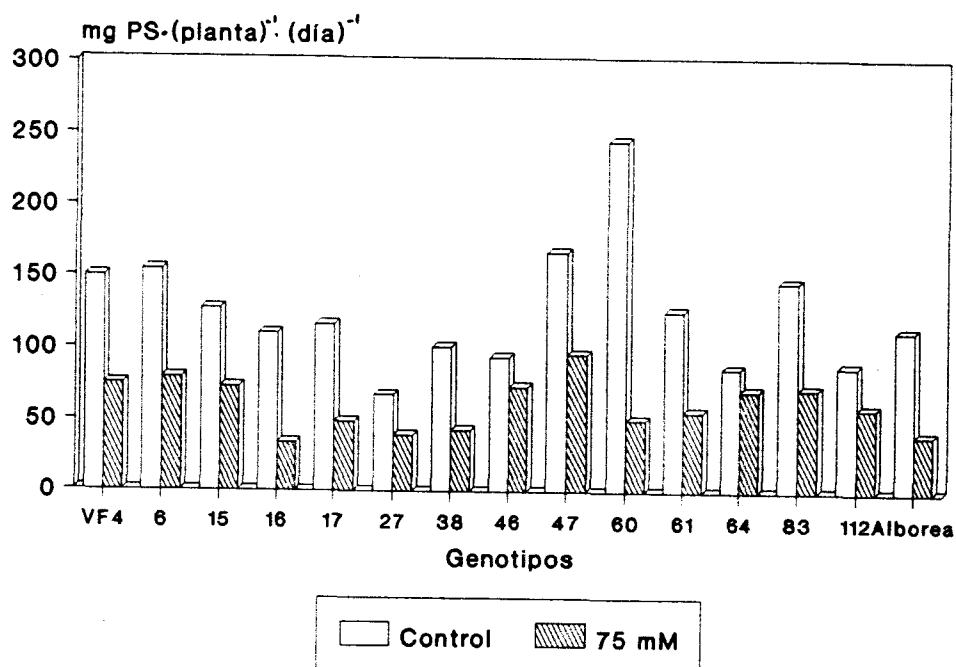


Figura 7.2. Efecto del NaCl (75 mM) sobre la TCA, expresada en  $mg \text{ PS} \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot (\text{día})^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 29.61

Otro parámetro relacionado con el crecimiento es la relación R/PA, cuyos resultados se muestran en la tabla 7.1. El tratamiento fue responsable del 61.25% ( $P \leq 0.05$ ) de la variabilidad encontrada, suponiendo un incremento en algunos de los genotipos que se hizo significativo en VF16, VF17, VF27 y VF83, aumentando un 20% aproximadamente.

**Tabla 7.1.** Efecto del NaCl (75 mM) sobre la relación peso seco de raíz/parte aérea de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control.

Genotipo	NaCl (mM)	R/PA	Genotipo	NaCl (mM)	R/PA
VF4	Control	0.33	VF46	Control	0.50
	75	0.43		75	0.42
VF6	Control	0.41	VF47	Control	0.34
	75	0.38		75	0.34
VF15	Control	0.31	VF60	Control	0.47
	75	0.31		75	0.43
VF16	Control	0.38	VF61	Control	0.40
	75	0.50		75	0.44
VF17	Control	0.36	VF64	Control	0.42
	75	0.43		75	0.40
VF27	Control	0.30	VF83	Control	0.47
	75	0.43		75	0.57
VF38	Control	0.38	VF112	Control	0.42
	75	0.40		75	0.41
			Alborea	Control	0.30
				75	0.51
MDS (0.05)		0.07			

El número de nódulos por planta disminuyó, siendo significativo para los genotipos VF16, VF17, VF27, VF47 y VF60 (Fig. 7.3).

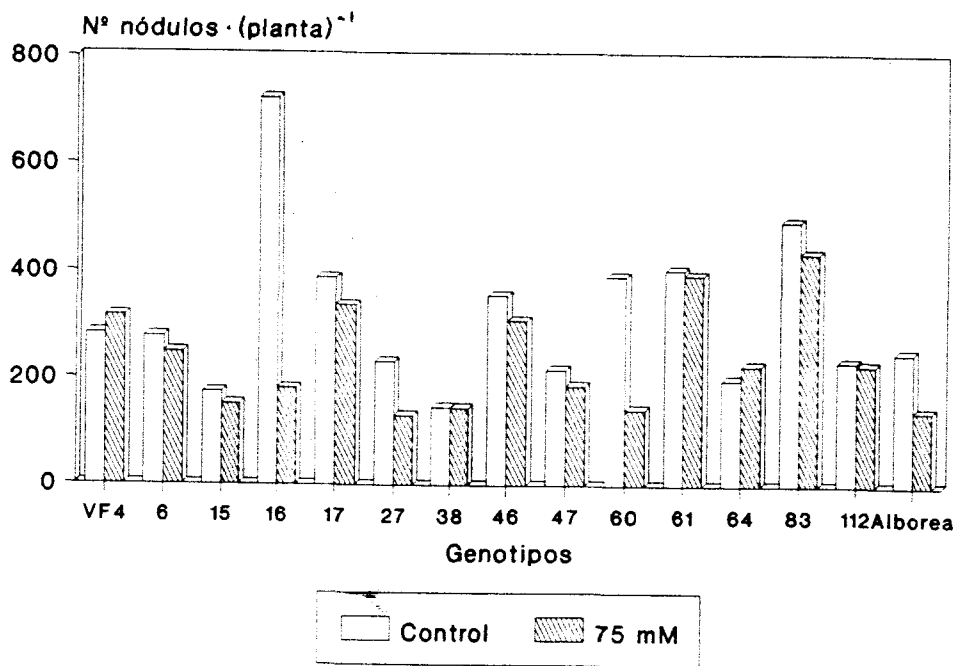


Figura 7.3. Efecto del NaCl (75 mM) sobre el número de nódulos por planta de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 60.58

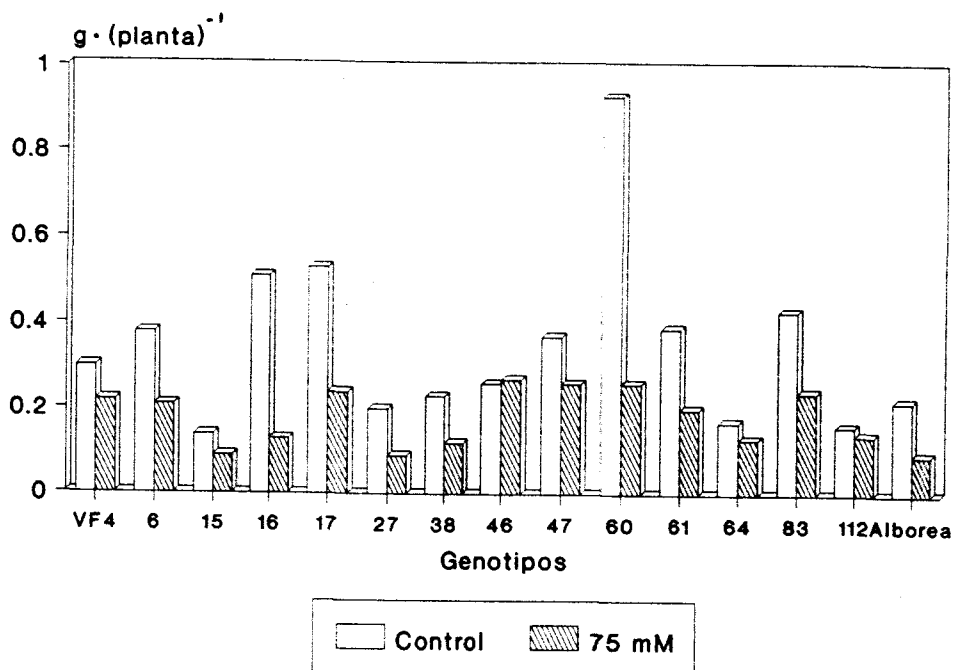


Figura 7.4. Efecto del NaCl (75 mM) sobre el peso seco de nódulos, expresado en g PS · (planta)<sup>-1</sup>, en distintos genotipos de *V. faba* inoculados con al cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 0.07

El crecimiento de los nódulos (Fig. 7.4) se inhibió de forma significativa en 9 genotipos, entre los que destacan VF16 y VF60, con una inhibición del 75%. Cuando la masa nodular se relaciona con el crecimiento de la parte aérea se obtiene el peso normalizado de nódulos (Fig. 7.5), afianzándose los datos sobre el efecto negativo del NaCl en el desarrollo de la masa nodular, siendo responsable del 65% de la variabilidad observada. La mayoría de los genotipos presentó una inhibición del 25%, VF4 y VF46 la presentaron del 40%. Fueron 5 los genotipos que no se afectan significativamente ( $P \leq 0.05$ ), destacándose VF6, VF17 y VF64 que no presentan ninguna inhibición.

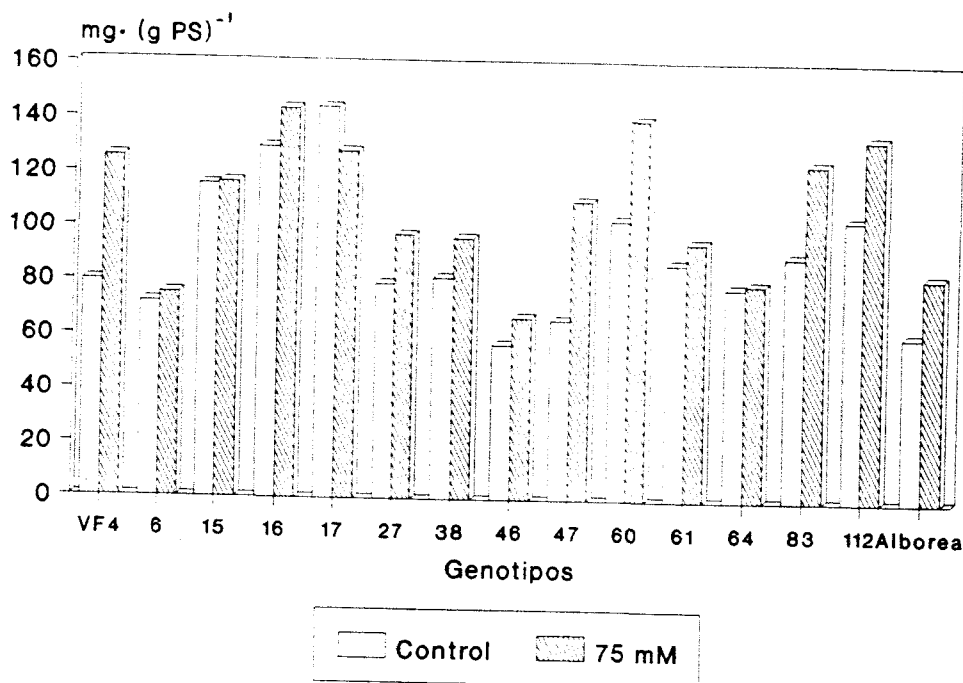


Figura 7.5. Efecto del NaCl (75 mM) sobre el peso normalizado de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PS})^{-1}$  de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 17.71

## 7.2. Actividad nitrogenasa

En la figura 7.6 se exponen los resultados de actividad nitrogenasa específica en los distintos genotipos, valorada mediante el test de reducción de acetileno. En todos ellos se inhibió fuertemente hasta valores mínimos ( $5-1 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), siendo la principal fuente de variabilidad, con un efecto del 98% ( $P \leq 0.05$ ).

La actividad nitrogenasa por planta (Fig. 7.7) mostró un comportamiento parecido a la actividad nitrogenasa específica, inhibiéndose con valores mínimos inferiores a  $1 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

## 7.3. Actividades enzimáticas de la fracción vegetal de los nódulos

Las actividades GS y NADH-GOGAT (Fig. 7.8) se afectaron de forma parecida por el NaCl con una clara inhibición de su actividad en todos los genotipos ensayados. Destacan VF6, VF61 y VF83 con una inhibición media del 75% en ambas actividades. Por el contrario VF15 sólo se inhibió un 20%. El resto de los genotipos se inhibieron entre un 40 y un 50%.

La proteína soluble (Tab. 7.2) se inhibió significativamente en la mayoría de los genotipos por la presencia de NaCl, suponiendo un efecto sobre la variabilidad encontrada del 96% ( $P \leq 0.05$ ). El genotipo VF15 mantuvo sus niveles de proteína, mientras que VF6 se inhibió un 52%.

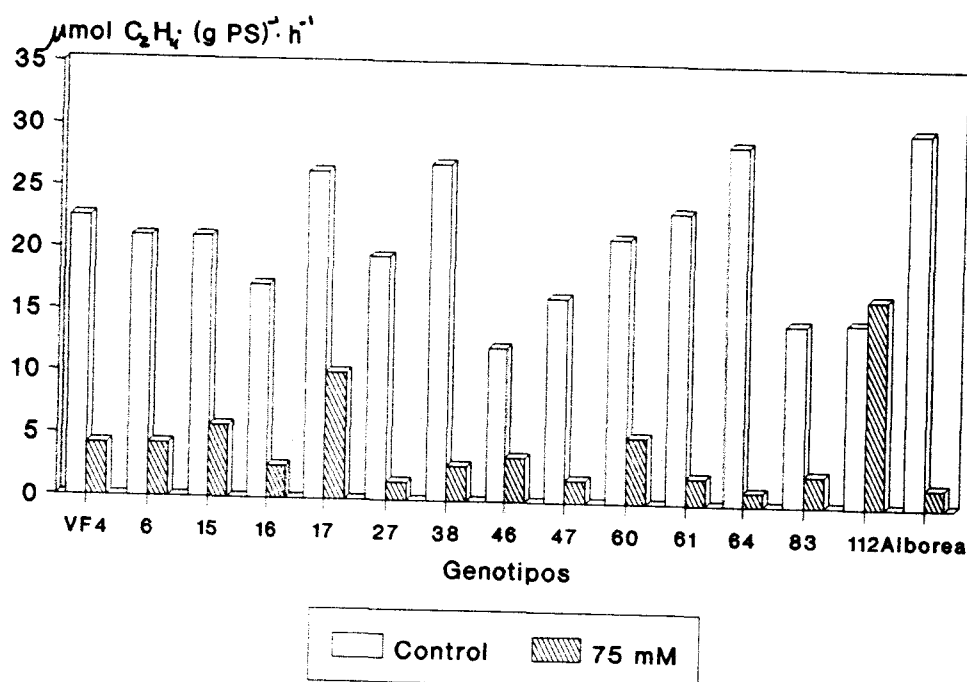


Figura 7.6. Efecto del NaCl (75 mM) sobre la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{g PS})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de nódulos de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con el cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 3.30

Tabla 7.2. Efecto del NaCl (75 mM) sobre el contenido en proteína soluble de nódulos, expresado en  $\text{mg} \cdot (\text{g PF})^{-1}$  de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control.

Genotipo	NaCl (mM)	R/PA	Genotipo	NaCl (mM)	R/PA
VF4	Control	12.44	VF46	Control	10.52
	75	7.60		75	8.94
VF6	Control	13.23	VF47	Control	12.32
	75	6.32		75	8.32
VF15	Control	10.15	VF60	Control	10.58
	75	10.89		75	7.29
VF16	Control	10.08	VF61	Control	10.36
	75	8.30		75	6.93
VF17	Control	11.33	VF64	Control	12.48
	75	7.26		75	10.45
VF27	Control	12.22	VF83	Control	11.83
	75	10.24		75	7.42
VF38	Control	11.82	VF112	Control	10.24
	75	9.26		75	7.36
			Alborea	Control	10.89
				75	8.16
MDS (0.05)		1.39			

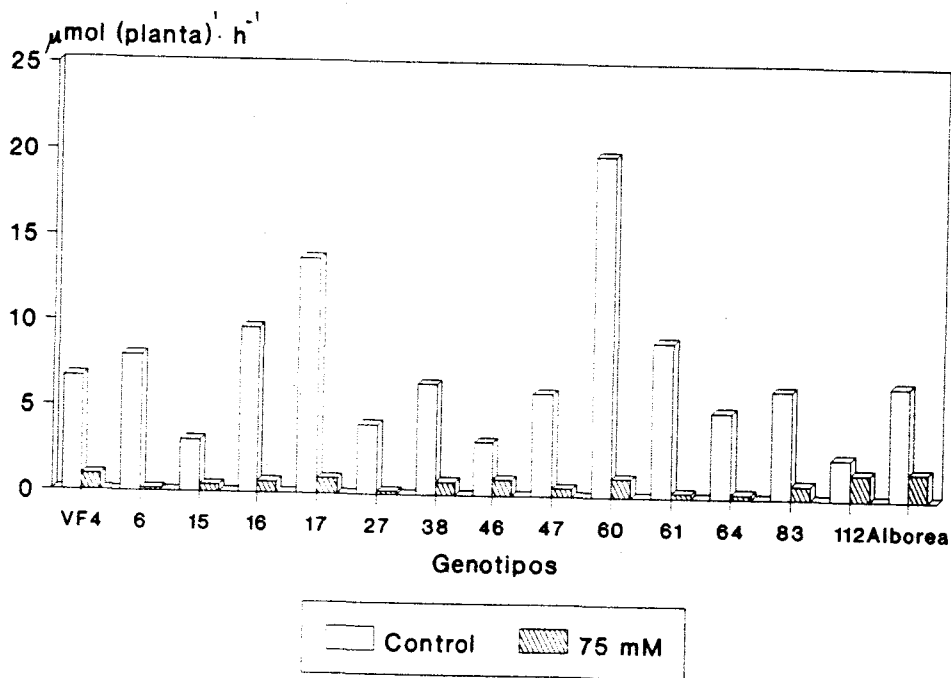


Figura 7.7. Efecto del NaCl (75 mM) sobre la actividad reductora de acetileno, expresada en  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot (\text{planta})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 1.66

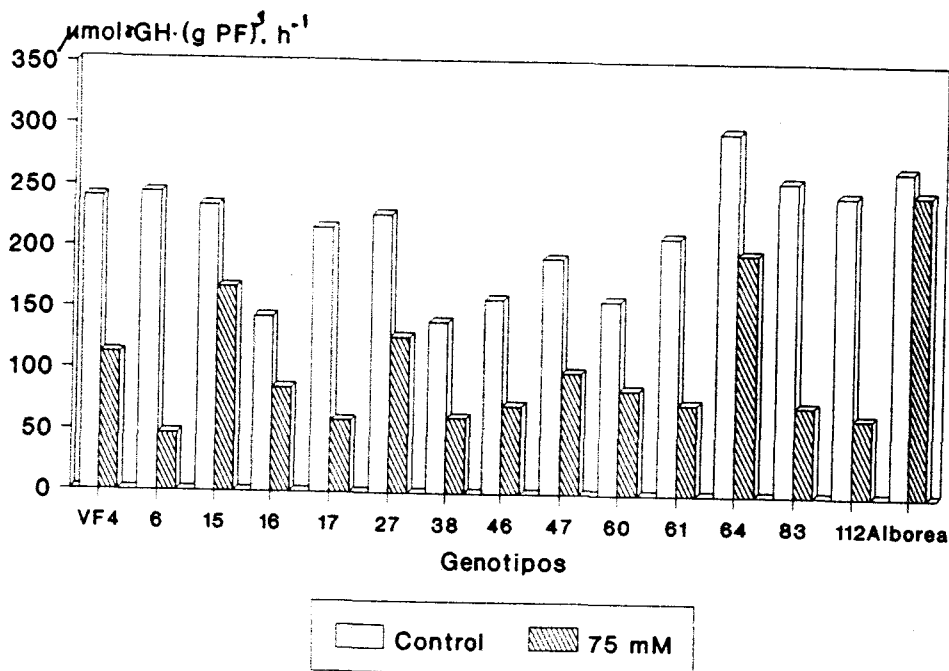


Figura 7.8. Efecto del NaCl (75 mM) sobre las actividades glutamina sintetasa, expresada en  $\mu\text{mol } \gamma\text{GH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 12.74

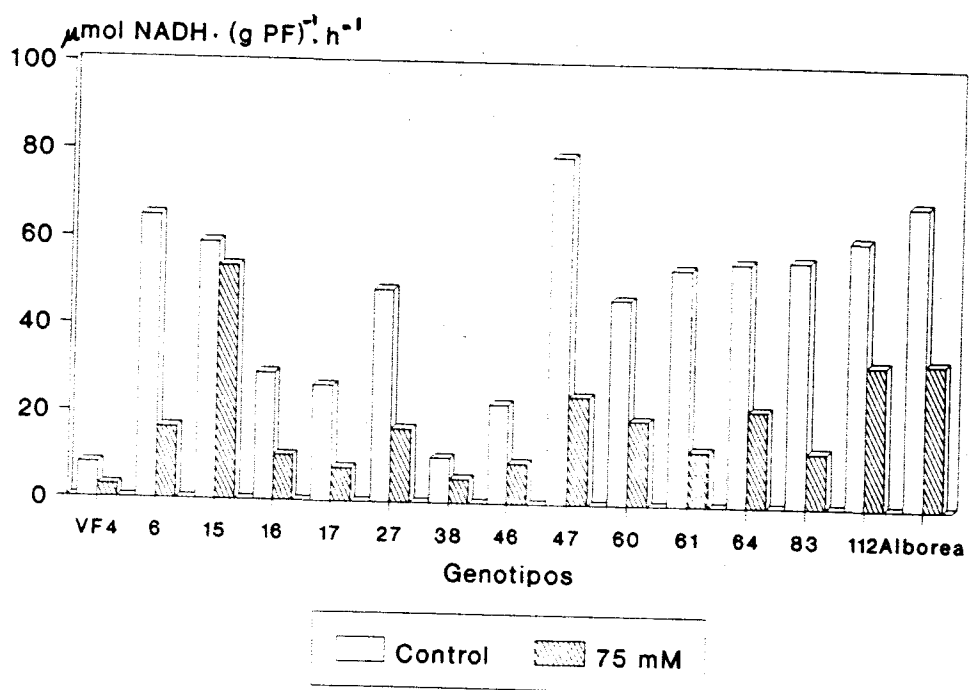


Figura 7.9. Efecto del NaCl (75 mM) sobre la actividad glutamato sintasa, expresada en  $\mu\text{mol NADH} \cdot (\text{g PF})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , de distintos genotipos de *V. faba* inoculados con la cepa GRA19 de *R. leguminosarum*. Plantas crecidas sin sal sirvieron como control. MDS (0.05) = 1.91



1. La mayoría de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* utilizadas mostraron una inhibición del 80% en su crecimiento en vida libre en presencia de NaCl; si bien las cepas GRL8, GRA19 y GRI32 presentaron una alta viabilidad, considerándose cepas útiles para ensayar en suelos salinos.
2. Las actividades enzimáticas, implicadas en la asimilación del amonio, de la fracción vegetal de nódulos efectivos de *Vicia faba* L., alcanzaron sus niveles máximos tras el disparo de la actividad nitrogenasa específica a modo de señal. Estas actividades decaen cuando la planta entra en período reproductor.
3. Los enzimas de la asimilación del amonio en nódulos de *V. faba* experimentan cambios de actividad a lo largo del fotoperiodo, alcanzando valores máximos y mínimos que se repiten cíclicamente cada 16 h.
4. La utilización de una doble cromatografía de intercambio iónico no resultó aclaratoria a cerca de las posibles isoformas de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* como se ha detectado en otras especies de leguminosas.
5. El peso molecular de la subunidad de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba* se aproximó a 195 kDa. La estimación del peso molecular nativo es de 229 kDa, por lo que nos reafirmamos en su naturaleza de un monómero al igual que en otras especies vegetales.
6. El ensayo de los anticuerpos de la NADH-GOGAT de nódulos de *V. faba*, por "Western blot", frente a extractos de raíz dio una banda de reconocimiento que no se detectó para extractos de bacteroides y de hojas.
7. El crecimiento del cv. Alborea de *V. faba* en presencia de distintas concentraciones de NaCl desde el inicio del cultivo se afectó por concentraciones superiores a 50 mM de NaCl, la nodulación se inhibió en un porcentaje semejante a la inhibición del crecimiento de la cepa con que se inoculó (GRA19) en vida libre.
8. Las líneas puras de *V. faba* utilizadas en el estudio de la sensibilidad al NaCl (75 mM) presentaron una inhibición clara de todos sus parámetros, inhibición que fue menos acentuada en el cv. Alborea.

## **Bibliografía**

- Abdul-Kadir, S.M. y Paulsen, G.M. (1982) Effect of salinity on nitrogen metabolism in wheat. *J. Plant Nutr.* **5**: 1141-1151.
- Alston, A.M. y Graham, R.D. (1982) The influence of soil nitrogen status and previous crop on nitrogen fixation (acetylene reduction) in barrel medic, *Medicago truncatula* Gaertn. *Aust. J. Soil Sci.* **27**: 462-469.
- Allen, O.N. (1957) Experiments in soil bacteriology. Burgess Publishing Minnesota. Minneapolis.
- Allen, O.N. y Allen, E.K. (1981) The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. Wisconsin. The University of Wisconsin Press, Madison. 812 pp.
- Anderson, M.P.; Vance, C.P.; Heichel, G.H. y Miller, S.S. (1989) Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* **90**: 351-358.
- Appelbaum, E. (1990) The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-Legume Symbiosis. En: Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation. Ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 131-151.
- Aslam, M., Huffaker, R.C. y Rains D.W. (1984) Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.* **76**: 321-325.
- Avila, C; Botella, J.R.; Cánovas, F.M.; Núñez de Castro, I. y Valpuesta, V. (1987) Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **85**: 1036-1039.
- Awonaike, K.O.; Lea, P.J. y Mifflin, B.J. (1981) The location of the enzymes of ammonia assimilation in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Sci. Lett.* **23**: 189-195.
- Bajpai, P.D. y Gupta, B.R. (1979) Effect of salinization, phosphorus fertilization and their interaction on the symbiosis between *Rhizobium trifolii* and berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) *J. Indian Soc. Soil Sci.* **27**: 426-429.
- Ball, M.C. y Anderson, J.M. (1986) Sensitivity of photosystem II to NaCl in relation to salinity tolerance. Comparative studies with thylakoids of the salt-tolerant mangrove, *Avicennia marina*, and the salt-sensitive pea, *Pisum sativum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: 689-698.
- Becana, M. y Bedmar, E.J. (1990) Metabolismo del nitrato y oxígeno en nódulos de leguminosas. Colección Nuevas tendencias. C.S.I.C.
- Becana, M. y Sprent, J.I. (1987) Nitrogen fixation and nitrate reductase in the root nodules of legumes. *Physiol. Plant.* **70**: 757-765.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. (1985a) Nitrate and nitrite reduction by alfalfa root nodules: Accumulation of nitrite in *Rhizobium meliloti* bacteroids and senescence of nodules. *Physiol. Plant.* **64**: 353-358.
- Becana, M.; Aparicio-Tejo, P.M. y Sánchez-Díaz, M. (1985b) Nitrate and nitrite reduction by alfalfa root nodules. *Physiol. Plant.* **65**: 185-188.
- Bedmar, E.J.; Edie, S.A. y Phillips, D.A. (1983) Host plant cultivar effect on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Physiol.* **72**: 1011-1015.

- Beevers, N. y Hageman, R.H. (1980) Nitrate and nitrite reduction. En: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. P.K Stumpf y E.E. Conn (eds.). Academic Press. New York. pp 115-168.
- Beevers, L. y Storey, R. (1976) Glutamate synthase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. Plant Physiol. 57: 862-866.
- Bekki, A., Trinchant, J-C. y Rigaud, J. (1987) Nitrogen fixation ( $C_2H_2$  reducción) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. Physiol. Plant. 71: 61-67.
- Bello, A.B.; Cerón-Díaz, W.A.; Nickell, C.D.; El Sherif, E.O. y Davis, L.C. (1980) Influence of cultivar, between row spacing, and plant population on fixation of soybeans. Crop. Sci. 20: 751-755.
- Bennet, M.J. y Cullimore, J.V. (1989) Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. Planta 179: 433-440.
- Bergersen, F.J. y Turner, G.L. (1967) Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean nodules. Biochim. Biophys. Acta 141: 507-515.
- Berger, M.G. y Fock, H.P. (1983) Effects of methionine sulfoximine and glycine on nitrogen metabolism of maize leaves in the light. Aust. J. Plant. Physiol. 10: 187-194.
- Bernstein, L. y Hayward, H.E. (1958) Physiology of salt tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. 9: 25-46.
- Bhardwaj, K.K. (1975) Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkali soils. Plant Soil. 43: 377-385.
- Billard, J.P., Binet, P. y Boucaud, J. (1982) Modification électrophorétiques des protéines solubles foliaires de *Suaeda maritima* var. *macrocarpa*, *Atriplex hortensis* et *Phaseolus vulgaris* in relation avec la teneur en NaCl du milieu de culture. Can. J. Bot. 60: 1590-1595.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1988) Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. Plant Physiol. 86: 607-614.
- Bishop, P.E. (1990) Genetics of alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. Resúmenes 8th International Congress on Nitrogen Fixation. Knoxville, Tennessee, USA. p. L-51.
- Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L. y Hetherington, D.R. (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 7342-7346.
- Bishop, P.E.; Premakumar, R.; Joeger, R.D.; Jacobson, M.R.; Dalton, D.A.; Chisnell, J.R. y Wolfinger, E. D. (1988) Alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. En: Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation. Colonia, Alemania. H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton (eds), pp. 71-79. Gustav Fisher, Stuttgart.
- Bisseling, T.; Franssen, H.; Govers, F.; Horwath, B.; Moerman, M.; Scheres, B.; van de Wield, C. y Yang, W.-C. (1991) Early nodulins in pea and soybean nodule development. En: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction. Hennecke, H. y Verma, D.P.S.(eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Vol. 1: 300-303.

- Boland, M.J. (1979) Kinetic mechanism of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* **99**: 531-539.
- Botella, J.R.; Verbelen, J.P. y Valpuesta, V. (1988) Immunolocalization of ferredoxin-GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **87**: 255-257.
- Bouat, A. y Crouzet, C. (1965) Notes techniques sur un appareil semiautomatique de clorage l'azote et des certains composés volatiles. *Ann. Agric.* **16**: 107-118.
- Bowsher, C.G.; Emes, M.J.; Cammack, R. y Hucklesby, D.P. (1988) Purification and properties of nitrite reductase from roots of pea (*Pisum sativum* cv. Meteor). *Planta.* **175**: 334-340.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brewin, N.J. (1984) Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen-fixing symbionts. En: *Genes Involved in Plant-Microbe Interactions*. D.P.S. Verma y T. Hohn (eds.), pp. 179-203. Springer-Verlag, New York/Vienna.
- Brown, A.D. (1976) Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803.
- Brugnoli, E. y Lauter, M. (1991) Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant *Gossypium hirsutum* L. and salt-sensitive *Phaseolus vulgaris* L. *C<sub>3</sub> non-halophytes*. *Plant Physiol.* **95**: 628-635.
- Bulen, W.A. y LeCompte, J.R. (1966) The nitrogenase system from *Azotobacter*: two enzyme requirement for nitrogen reduction, ATP-dependent H<sub>2</sub> evolution, and ATP hidrolisis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **56**: 979-984.
- Burris, R.H. (1972) Nitrogen fixation-assay methods and techniques. *Methods in Enzymology, IV*. S.P. Colowick y N.O. Kaplan (eds.). Academic Press, New York, 415 pp.
- Caba, J.M. (1991) Variabilidad genotípica del metabolismo simbiótico en *Vicia faba*: Efecto del nitrato. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 435 pp.
- Caba, J.M.; Lluch, C.; Hervás, A. y Ligeró, F. (1990) Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.* **79**: 531-539.
- Cammaerts, D.M. y Jacobs, M (1984) A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* **31**: 65-73.
- Cammaerts, D.M. y Jacobs, M (1985) A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **163**: 517-526.
- Carlson, R.W. (1982) Surface chemistry, En: *Nitrogen Fixation, Vol 2. Rhizobium*, Broughton, W.J., Ed.. Claredon Press, Oxford, 199 pp.
- Carnahan, J.E.; Mortenson, K.E.; Mower, H y Castle, J.C. (1960) Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta* **44**: 520-535.

- Clausen, H. y Hansen, V. (1968) Landökonomisk forsöglaboratorium. Arsbog, pp. 45-58. Landökonomisk forsöglaboratorium. Copenhagen.
- Craig, G.F., Atkins, C.A. y Bell, D.T. (1991) Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil*, **133**: 253-262.
- Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Cubero, J.I. y Suso, M.J. (1981) Primitive and modern forms of *Vicia faba*. *Z. Kulturpfl.* **29**: 137-145.
- Cullimore, J.V. y Sims, A.P. (1981) An association between photorespiration and protein catabolism: studies with *Chlamidomonas*. *Phytochem.* **20**: 597-600.
- Cullimore, J.V.; Lara, M.; Lea, P.J. y Miflin, B.J. (1983) Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* **157**: 245-253.
- Chaillou, S.; Morot-Gaudry, J.F., Salsac, L., Lesaint, C. y Jolivet, E. (1986) Compared effects of nitrate and ammonium on growth and metabolism of French bean. *Physiol. Veg.* **24**: 679-687.
- Chatt J. (1980) Chemistry relevant to the biological fixation of nitrogen. En: *Nitrogen Fixation*. W.P.D. Stewart y J.R. Gallon (eds). Academic Press. Londres, pp. 1-17.
- Chen, F.-L. y Cullimore, J.V. (1988) Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **88**: 1411-1417.
- Chen, F.-L. y Cullimore, J.V. (1989) Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **179**: 441-447.
- Chen, F.-L.; Bennett, M.J. y Cullimore, J.V. (1990) Effect of the nitrogen supply on the activities of isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase and glutamine synthetase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* **231**: 1215-1221.
- Dailey, F.A.; Warner, R.L.; Somers, D.A. y Kleinhofs, A. (1982) Characteristics of a nitrate reductase barley mutant deficient in NADH:nitrate reductase. *Plant Physiol.* **69**: 1200-1204.
- Dart, P.J. (1977) Infection and development of leguminous nodules. En: *A treatise on dinitrogen fixation: section III; Biology*. R.W.R. Hardy y W.S. Silver (eds.), pp. 367-472. Wiley Interscience, New York.
- Day, D.A.; Ou Yang, L.-J. y Udvardi, M.K. (1990) Nutrient exchange across the peribacteroid membrane of isolated symbiosomes. En: *Nitrogen fixation: Achievements and objectives*. P.M. Gresshoff, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Chapman and Hall. New York.
- De Lajudie, P. y Huguet, T. (1988) Plant gene expression during effective and ineffective nodule development of the tropical stem-nodulated legume *Sesbania rostrata*. *Plant. Molec. Biol.* **10**: 537-548.
- Dixon, R.O.D. (1972) Hydrogenase in legume root bacteroids: occurrence and properties. *Arch. Microbiol.* **85**: 193-201.

- Dixon, R.O.D.; Berlier, Y.M. y Lespinat, P.A. (1981) Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soyabean and pea. *Plant Soil*. **61**: 135-143.
- Djordjevic, M.A.; Schofield, P.R. y Rolfe, B.G. (1985) Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes results in mutants with altered host-range ability. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 463.
- Dreyfus, B.; García, J.L. y Gillis, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 89-98.
- Dubey, R.S. (1985) Effect of salinity on nucleic acid metabolism of germinating rice seeds differing in salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.*, **12**: 9-16.
- Dubey, R.S. y Rani, M. (1987) Proteases and proteins in germinating rice seeds in relation to salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **14**: 174-182.
- Dubey, R.S. y Rani, M. (1989) Influence of NaCl salinity on growth and metabolic status of proteins and amino acids in rice seedlings. *J. Agro. Crop. Sci.*, **162**: 97-106.
- Dubey, R.S. y Sharma, K.N. (1990) Behaviour of phosphatases in germinating rice in relation to salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.*, **28**: 17-26.
- Duc, G. (1980) Activité fixatrice d'azote des légumineuses. Possibilités de sélection. Beaucouzé. Angers, 24-26 Sept.
- Egli, M.A.; Griffith, S.M.; Miller, S.S.; Anderson, M.P. y Vance, C.P. (1989) Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* **93**: 898-904.
- Egli, M.A.; Larson, R.J.; Hruschka, W.R. y Vance, C.P. (1991) Synthesis of nodulins and nodule-enhanced polypeptides by plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *J. Exp. Bot.* **44**: 969-997.
- Eisbrenner, G. y Evans, H.J. (1983) Spectral evidence for a component involved in hydrogen metabolism of soybean nodule bacteroids. *Plant Physiol* **70**: 1667-1672.
- Elsheikh, E.A.E. y Wood, M. (1990) Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* **41**: 1263-1269.
- Epstein, E. (1985) Salt-tolerant crops: Origins, development and prospects of the concept. *Plant Soil*. **89**: 187-198.
- Evans, H.J. (1954) Diphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase from soybean nodules. *Plant Physiol.* **29**: 298-301.
- Evans, H.J.; Purohit, K.; Cantrell, M.A.; Eisbrenner, G.; Russell, S.A.; Hanus, F.J. y Lepo, J.E. (1981) Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. En: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. A.H. Gibson y W.E. Newton (eds.), pp. 84-96. Australian Academy of Science. Camberra.

- Evans, H.J.; Russell, S.A.; Hanus, F.J.; Harker, A.R.; Lambert, G.R. y Dalton, D.A. (1985) Biochemical characterization, evaluation and genetics of hydrogen recycling in *Rhizobium*. En: Nitrogen Fixation and carbon dioxide metabolism. P.W. Ludden y J. E. Burris (eds). Elsevier Science Publishing Co. pp. 3-11.
- Evans, H.J.; Russell, S.A.; Hanus, F.J.; Harker, A.R.; Pappen, H.; Zuber, M. (1987) Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 335-361.
- Faria, S.M.; Hay, G.T. y Sprent J.I. (1988) Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2291-2296.
- Farnden, K.J.F. y Robertson, J.G. (1980) Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. En: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. F.J. Bergersen (ed.), John Wiley & Sons, Ltd., pp. 265-314.
- Farquhar, G.D., O'Leary, M.H. y Berry, J.A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: 121-137.
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. y Hubick, K.T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 503-537.
- Finan, T.M.; Hirsch, A.M.; Leigh, J.A.,; Johansen, E.; Kuldau, G.A.; Deegan, S.; Walker, G.C. y Signer, E.R. (1985) Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell.* **40**: 869.
- Fischer, P. y Klein, U. (1988) Localization of nitrogen assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamidomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **88**: 947-952.
- Ford, C.W. (1984) Accumulation of low molecular weight solutes in water-stressed tropical legumes. *Phytochem.* **23**: 1007-1015.
- Forde, B.J. y Cullimore, J.V. (1989) The molecular biology of glutamine synthetase in higher plant. *Oxf. Surv. Plant Mol. Biol.* **6**: 247-296.
- Forde, B.J.; Day, H.M.; Turton, J.F.; Shen, W.J.; Cullimore, J.V. y Oliver, J.E. (1989) Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial pattern of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plant. *Plant Cell.* **1**: 391-401.
- Fougère, F., Le Rudulier, D. y Streeter, J.G. (1991) Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **96**: 1228-1236.
- Gallon, J.R. y Chaplin, A.E. (1987) Nitrogen Fixation in Perspective. En: An Introduction to Nitrogen Fixation. J.R. Gallon y A.E. Chaplin (eds.), pp. 1-10. Cassell, Londres.
- Giannakis, C.; Nicholas, D.J.D y Wallace, W. (1988) Utilization of nitrate by bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean root nodule. *Planta* **174**: 51-58.
- Gloude-mans, T.; De Vries, S.C.; Bussink, H.J.; Malik, N.S.A.; Franssen, H.J.; Louwerse, J. y Bisseling, T. (1987) Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Mol. Biol.* **8**: 395.



- Govers, F.; Gloude-mans, T.; Moerman, M.; Van Kammen, A. y Bisseling, T. M (1985) Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.* **4**: 861-867.
- Govers, F.; Nap, J.P.; Van Kammen, A. y Bisseling, T. (1987) Nodulins in the developing root nodule. *Plant. Physiol. Biochem.* **25**: 309.
- Greenway, H. y Munns, R. (1980) Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Groat, R.G. y Vance, C.P. (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **67**: 1198-1203.
- Guerrero, M.G.; Vega, J.M. y Losada, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 169-204.
- Hafeez, F.Y., Aslam, Z. y Malik, K.A. (1988) Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* L. Wilczek. *Plant Soil*, **106**: 3-8.
- Hagberg, A. y Sjodin, J. (1975) Broad bean. En: Food Protein Sources. Pirie N.W. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 117-119.
- Handa, S., Handa, A.K, Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A. (1986) Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* **80**: 938-945.
- Hanelt, P. (1972) Die infraspezifische Variabilität von *Vicia faba* L. und ihre Gliederung. *Kult'pflanz.* **20**: 75-128.
- Hanson, A.D. y Hitz, W.D. (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Hecht, U.; Oelmüller, R.; Schmidt, S. y Mohr, H. (1988) Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta.* **175**: 130-138.
- Heichel, G.H.; Barnes, D.K. y Vance, C.P. (1981) Nitrogen fixation of alfalfa in the seedling year. *Crop. Sci.* **21**: 330-335.
- Herdina y Silsbury, J.H. (1991a) Estimating nitrogenase activity of faba bean (*Vicia faba*) by acetylene reduction (AR) assay. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**: 489-502.
- Hervás, A. (1988) Selección de razas de *Rhizobium leguminosarum* y su tolerancia al nitrógeno combinado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 396 pp.
- Hervás A., Caba J.M., Ligeró F. and Lluch C. (1991) Effect of combined nitrogen on dinitrogen fixation and productivity in *Pisum Sativum* L. inoculated with different strains of *Rhizobium*. *Chemosphere* **22**: 1153-1160.
- Hirasawa, M. y Tamura, G. (1984) Flavin and iron-sulfur containing ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaves. *J. Biochem.* **95**: 983-994.

- Hirel, B.; Perrot-Rechenmann, C.; Suzuki, A.; Vidal, J. y Gadal, P. (1982) Glutamine synthetase in spinach leaves and immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* **69**: 983-987.
- Hirel, B.; Bouet, C.; King, B.; Layzell, D.; Jacobs, F. y Verma, D.P.S. (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* **6**: 1167-1171.
- Höpfner, M.; Reifferscheid, G. y Wild, A. (1988) Molecular composition of glutamine synthetase of *Sinapis alba* L. *Z. Naturforsch.* **43c**: 194-198.
- Höpfner, M.; Ochs, G. y Wild, A. (1990) Glutamine synthetases of green and etiolated leaves of *Sinapis alba*. *Planta.* **181**: 155-161.
- Hopmans, P., Douglas, L.A. y Chalk, P.M. (1984) Effect of soil salinity and mineral nitrogen on the acetylene reduction activity of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Agric. Res.* **35**: 9-15.
- Hunt, S.; Gaito, S.T. y Layzell, D.B. (1988) Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characterisation of the diffusion barrier and estimation of the concentrations of CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> in the infected cells. *Planta* **173**: 128-141.
- Hutchinson, J. (1964) The genera of flowering plants. Dicotyledones, 1. 516 pp. Clarendon Press, Oxford.
- Imperial, J.; Vinod K.S.; Hoover, T.R. y Ludden P.W. (1988) Characterization of components involved in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. En: Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation. Colonia, Alemania. H. Bothe, F.J. de Bruijn y W.E. Newton (eds), p. 128. G. Fischer, Stuttgart.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. y Sánchez-Díaz, M. (1992) Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: Photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiol. Plant.* **84**: 67-72.
- Irigoyen, J.J.; Emerich, D.W. y Sánchez-Díaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugar in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* **84**: 55-60.
- Itagaki, T.; Dry, I.B. y Wiskich, J.T. (1988) Purification and properties of NAD-glutamate dehydrogenase from turnip mitochondria. *Phytochem.* **27**: 3373-3378.
- Jeschke, W.D., Wolf, O. y Hartung, W. (1992) Effect of NaCl salinity on flows and partitioning of C, N, and mineral ions in whole plants of white lupin, *Lupinus albus* L. *J. Exp. Bot.* **43**: 777-788.
- Jordan, D.C. (1984) *Rhizobiaceae*. En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 ed. R.E. Buchanan y N.E. Gibson, (eds). Williams y Wilkins Co. Baltimore. pp. 302-324.
- Kaiser, J.J. y Lewis, O.A.H. (1984) Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* **70**: 127-130.
- Kassem, M., Capellano, A. y Gounot, A.M. (1985) Effets du chlorure de sodium sur la croissance *in vitro*, l'infectivité et l'efficiencia de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN J.* **1**, 63-75.

- Kay, D.E. (1979) Legumbres alimenticias. Editorial Acribia. S.A.
- Kendall, A.C.; Wallsgrave, R.M.; Hall, N.P.; Turner, J.C. y Lea, P.J. (1986) Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**: 316-323.
- Kohl D.H.; Schubert K.R.; Carter M.B.; Hagedron C.H. y Shearer, G. (1988) Proline metabolism in nitrogen-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2036-2040.
- Kozlowski, T.T. (1972) Water deficits and plant growth. Academic Press. Inc., New York, pp. 177-216.
- Kumar, P.A. y Abrol. Y.P. (1990) Ammonia Assimilation in Higher Plants. En: Nitrogen in Higher Plants. Y.P. Abrol (ed.), pp. 159-179. Research Studies Press LTD. Taunton, Somerset, Gran Bretaña.
- La Rue, T.A. y Patterson, T.G. 1981. How much nitrogen do legumes fix? *Adv. Agron.* **24**: 15-39.
- 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.
- Lachica, M.; Aguilar, A. y Yañez, J. (1973) Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín (II). *An. Edaf. y Agrobiol.* **XXXII**: 1033-1047.
- Lara, M.; Cullimore, J.V.; Lea, P.J.; Mifflin, B.J.; Johnston, A.W.B. y Lamb, J.W. (1983) Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **157**: 254-258.
- Lara, M.; H. Porta; Padilla, J.; Folch, J. y Sanchez, F. (1984) Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **76**: 1019-1023.
- Lauter, D.J. y Clarkin, K.L. (1981) Salt response of chickpeas influenced by N supply. *Agron. J.* **73**: 961-966.
- Lea, P.J.; Blackwell, R.D.; Chen, F.-L. y Hecht, U. (1990) The enzymes of ammonia assimilation. En: *Methods in Plant Biochemistry*. P.J. Lea (ed.). Vol 3. pp. 129-144. Academic Press. Londres.
- Lenee, P. y Chupeau, Y. (1989) Development of nitrogen assimilating enzymes during growth of cells derived from protoplasts of sunflower and tobacco. *Plant Sci.* **59**: 109-117.
- Leonard, L.T. (1943) A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* **45**: 523-527.
- Lewis, O.A.M. y Pate, J.S. (1973) The significance of transpirationally derived nitrogen in protein synthesis in fruiting plants of pea (*Pisum sativum* L.) *J. Exp. Bot.* **80**: 596-606.
- Lewis, O.A.M., Leidi, E.O. y Lips, S.H. (1989) Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* **111**: 155-160.
- Li, Z.Z. y Gresshoff, P.M. (1990) Developmental and biochemical regulation of 'constitutive' nitrate reductase activity in leaves of nodulating soybean. *J. Exp. Bot.* **231**: 1231-1238.

- Ligero, F.; Caba J.M.; Lluch, C. y Olivares J. (1991) Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* **97**: 1121-1225.
- Lillo, C. (1984) Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.* **61**: 214-218.
- López-Ruiz, A.; Roldan, J.M.; Verbelen, J.P. y Díez, J. (1985) Nitrate reductase from *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiol.* **78**: 614-618.
- Loulakakis, C.A. y Roubelakis-Angelakis, K.A. (1990) Intracellular Localization and properties of NADH-Glutamate Dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: Purification and Characterization of the major leaf isoenzyme. *J. Exp. Bot.* **41**: 1223-1230.
- Mäck, G. y Tischner, R. (1990) Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **181**: 10-17.
- Manhart, J.R. y Wong, P.P. (1979) Nitrate reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1169-1174.
- Marques, I.A.; Oberholz, M.J. y Erismann, K.H. (1983) Effect of different inorganic nitrogen sources on photosynthetic carbon metabolism in primary leaves of non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **71**: 555-561.
- Martínez-Molina, E. y Olivares, J. (1982) A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 453-455.
- McNally, S.F. y Hirel, B. (1983) Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiol. Vég.* **21**: 761-779.
- McNally, S.F.; Hirel, B.; Gadal, P.; Mann, A.F. y Steward, G.R. (1983) Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* **72**: 22-25.
- McParland, R.H.; Guevara, J.G.; Becker, R.R. y Evans, H.J. (1976) The purification of the glutamine synthetase from the cytosol of soybean root nodules. *Biochem. J.* **153**: 597-606.
- Meeks, J.C.; Walk, C.P.; Schilling, N.; Shaffer, P.W.; Avissar, Y. y Chien, W.S. (1978) Initial organic products of fixation of <sup>13</sup>N-dinitrogen by root nodules of soybeans (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **61**: 980-983.
- Miao, G.-H.; Hirel, B.; Marsolier, M.C.; Ridge, R.W. y Verma, D.P.S. (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *The Plant Cell.* **3**: 11-22.
- Mifflin, B.J. y Lea P.J. (1980) Ammonia assimilation. En: *The Biochemistry of Plants. Vol. 5: Aminoacids and Derivates*, pp. 169-202. P.J. Stumpf y E.E. Conn (eds.). Academic Press. New York.
- Mikkonen, A. (1986) Activities of some peptidases and proteinases in germinating kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* **68**: 282-286.
- Millerd, A. (1975) Biochemistry of legume seed proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **25**: 53-72.

- Miranda-Ham, M.L. y Loyola-Vargas, V.M. (1988) Ammonia assimilation in *Canavalia ensiformis* plants under water and salt stress. *Plant Cell Physiol.* **29**: 747-753.
- Muñoz-Blanco, J. y Cardenas, J. (1989) Changes in glutamate dehydrogenase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* under different trophic and stress conditions. *Plant Cell Evir.* **12**: 173-182.
- Murotava, V. (1931) Common beans (*Vicia faba* L.). Suppl. of Bull. Appl. Bot. Genet. and Pl. Breed. (suppl. 50th).
- Nagel, M. y Hartmann, T. (1980) Glutamate dehydrogenase from *Medicago sativa* L.: Purification and comparative kinetic studies of organ-specific multiple forms. *Zeitschrift für Naturforschung.* **35C**: 406-415.
- Newcomb, W. (1981) Nodule morfogenesis. En: International Review of Cytology, Suppl. 13. G.H. Bourne y J.F. Danielli. Academic Press. New York. pp. 246-298.
- Ng, B.H. (1987) The effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen fixation of *Casuarina equisetifolia*. *Plant Soil.* **103**: 123-125.
- Nguyen, T.; Zelechowska, M.G.; Foster, V.; Bergmann, H. y Verma, D.P.S. (1985) Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding nodule-specific uricase localized in peroxisomes of uninfected cells of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5040-5044.
- Niemann, R.H. (1962) Some effects of sodium chloride on growth, photosynthesis and respiration of twelve crop plants. *Bot. Gaz.* **123**: 279-285.
- Oaks, A. y Hirel, B. (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 345-365.
- Ohyama, T. y Kumuzawa, K. (1980) Nitrogen assimilation in soybean nodules. I. The role of GS/GOGAT system in the assimilation of ammonia produced by nitrogen fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* **26**: 109-117.
- Pacovsky, R.S. y Fuller, G. (1991) Nitrogen assimilation and partitioning in two nitrogen-fixing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* **132**: 139-148.
- Pahlich, E. y Gerlitz, C. (1980) Deviation from Michaelis-Menten behaviour of plant glutamate dehydrogenase with ammonium as the variable substrate. *Phytochem.* **19**: 11-13.
- Pasqualini, S.; Lluch, C. y Antonielli, M. (1991) Seed storage proteins in several genetic lines of *Vicia faba*. *Plant Physiol. Biochem.* **29**: 507-515.
- Pate, J.S. (1973) Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 109-119.
- Pate, J.S. y Dart, P.J. (1961) Nodulation studies on legumes. IV. The influence of inocular strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant Soil.* **15**: 329-346.
- Pate, J.S. y Layzell, D.B. (1990) Energetics and biological cost of nitrogen asimilation. En: The Biochemistry of Plants. Vol. 16, pp. 1-41. P.J. Stumpf. y E.E. Conn (eds.). Academic Press. New York.

- Peoples, M.B. y Craswell, E.T. (1992) Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contribution to agriculture. *Plant Soil*. **141**: 13-39.
- Pessarakli, M. y Tucker, T.C. (1985) Ammonium ( $^{15}\text{N}$ ) metabolism in cotton under salt stress. *J. Plant. Nutr.* **8**: 1025-1045.
- Pessarakli, M., Huber, J.T. y Tucker, T.C. (1989) Protein synthesis in green beans under salt stress with two nitrogen sources. *J. Plant Nutr.* **12**: 1261-1377.
- Polhill, R.M. y Raven, P.H. (1981) *Advances in Legume Systematics*, Pt. I. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pueppke, S.G. (1986) Physiology of nodule initiation in the nitrogen-fixing legume-*Rhizobium* symbiosis. *Physiol. Plant.* **67**: 262-266.
- Rao, K.P. y Rains, D.W. (1976) Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.* **57**: 55-58.
- Rennenberg, H.J. (1984) Fate of excess sulfur in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 121-153.
- Reuber, T.L.; Reed, J.W.; Glazebrook, J.; Urzainqui, A. y Walker, G.C. (1991) Analyses of the roles of *R. meliloti* exopolysaccharides in nodulation. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. H. Hennecke y D.P.S. Verma (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 182-188.
- Rhodes, D.; Sims, A.P. y Folkes, B.F. (1980) Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor* L.. *Phytochem.* **19**: 357-365.
- Rhodes, D.; Brunk, D.G. y Magalhaes, J.R. (1989) Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase?. En: *Plant Nitrogen Metabolism*. J.E. Poulton, J.T. Romeo y E.E. Conn (eds.). Plenum Press, New York, pp. 191-206.
- Richards, J.E. y Soper, R.J. (1978) Effect of nitrogen fertilizer on yield, protein content and symbiotic nitrogen fixation in faba beans. *Agron. J.* **71**: 807-811.
- Rigaud, J. y Puppo, A. (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 223-228.
- Roberts, G.P.; Leps, W.T.; Silver, L.E. y Brill, W.J. (1980) Use of two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 414-422.
- Robertson, J.G. y K.J.F. Farnden (1980) Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 5, pp. 66-113. B.J. Mifflin (ed.). Academic Press, New York.
- Robinson, R.A.; Slade, A.P.; Fox, G.G.; Phillips, R.; Ratcliffe, R.G. y Stewart, G.R. (1991) The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* **95**: 509-516.
- Robson, A.D. (1989) The role of self regenerating pastures in rotation with cereals in Mediterranean areas. En: *The role of legumes in the Farming Systems of the Mediterranean Areas*. A.E. Osman, M.M. Ibrahim y M.A. Jones (eds). Kluwer Academic. Dordrecht. pp. 217-236.

- Robson, R.L.; Eady, R.R.; Richardson, T.H.; Miller, R.W.; Hawkins, M. y Postgate, J.R. (1986) The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* **322**: 388-390.
- Scheres, B.; Van de Wield, C.; Zalensky, A.; Horvath, B.; Spaink, H.; Van Eck, H.; Zwartkruis, F.; Wolters, A.M., Gloudemans, T.; Van Kammen, A. y Bisseling, T. (1990) The ENOD13 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*. **60**: 281-294.
- Scholl, M.H. y Elkan, G.H. (1984) *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 484-486.
- Schubert, K.R. y Evans, H.J. (1976) Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1207-1211.
- Schuster, C.; Schmidt, S. y Mohr, H. (1989) Effect of nitrate, ammonium, light and plastidic factor on the appearance of multiple forms of nitrate reductase in mustard cotyledons. *Planta* **177**: 74-83.
- Seeman, J.R. y Critchley, C. (1985) Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, **164**: 151-162.
- Seemann, J.R. y Sharkey, T.D. (1986) Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool size in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **82**: 555-560.
- Sequeira, L. (1986) Plant-bacterial interactions. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, Vol. 17, 187-211. A. Pirson y M.H. Zimmermann (eds.). Springer-Verlag, Berlín.
- Shannon, M.C. (1985) Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant Soil*. **89**: 227-241.
- Sheehy, J.E.; Minchin, F.R. y Witty, J.F. (1985) Control of nitrogen fixation in a legume nodule: An analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure. *Ann. Bot.* **55**: 549-562.
- Sheehy, J.E.; Bergersen, F.J.; Minchin, F.R. y Witty, J.F. (1987) A simulation study of gaseous diffusion resistance, nodule pressure gradient and biological nitrogen fixation in soybean nodules. *Ann. Bot.* **63**: 663-668.
- Shelp, B.J.; Sieciechowicz, K.I.; Ireland, R. y Joy, K.W. (1985) Determination of urea and ammonia in leaf extracts: Application to ureide metabolism. *Can. J. Bot.* **63**: 1135-1140.
- Sing, M.P., Pandey, S.K., Singh Maharaj, Ram P.C. y Singh, B.B. (1990) Mustard physiology under stress I. Photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and leaf chlorophyll content of *Brassica* genotypes grown under sodic conditions. *Photosynthetica* **24**.
- Singh, R.P. y Srivastava, H.H. (1986) Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* **66**: 413-416.
- Singleton, P.W. y Bohlool, B.B. (1984) Effecto of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* **74**: 72-76.

- Smirnov, N. y Stewart, G.R. (1987) Glutamine synthetase and ammonium assimilation in roots of zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Deschampsia cespitosa* L. Beauv. and *Anthoxanthum odoratum* L. *New Phytol.* **107**: 659-670.
- Sprent, J.I. (1989) Which steps are essential for the formation of functional legume nodules?. *New Phytol.* **111**: 129-153.
- Sprent, J.I., Sutherland, J.M. y Faria, S.M. (1987) Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organism. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **317**: 111-129.
- Srivastava, H.S. y Singh, R.P. (1987) Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochem.* **26**: 597-610.
- Stam, H.; van Verseveld, H.W.; De Vries, W. y Stouthamer, A. (1984) Hydrogen oxidation and efficiency of nitrogen fixation in succinate-limited chemostat cultures of *Rhizobium* ORS 571. *Arch. Microbiol.* **139**: 53-60.
- Stephens, B.D. y Neyra, C.A., (1983) Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* **71**: 731-735.
- Stewart G.R. y Lee, J.A. (1979) The rate of proline accumulation in halophytes. *Planta.* **120**: 279-289.
- Stewart, G.R.; Mann, A.F. y Fentem, P.A. (1980) Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol 5, 271-327. B.J. Mifflin (ed). Academic Press, New York.
- Stewart, G.R.; Mann, A.F. y Fentem, P.A. (1980) Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol 5, 271-327. B.J. Mifflin (ed). Academic Press, New York.
- Stewart, V. (1988) Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiological Rev.* **52**: 190-232.
- Streeter J.G. (1982) Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.* **69**: 1429-1434.
- Streeter J.G. (1985a) Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiol.* **77**: 321-324.
- Streeter J.G. (1985b) Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. II. Short term studies with high nitrate supply. *Plant Physiol.* **88**: 325-328.
- Streeter, J.G. (1988) Inhibition of legume nodule formation and nitrogen-fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* **7**: 1-23.
- Streit, L.; Martin, B.A. y Harper, J.E. (1987) A method for the separation and partial purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-types soybean leaves. *Plant Physiol.* **84**: 654-657.
- Subba Rao, N.S., Lakshmi-Jumari, M., Singh, C.S. y Magu, S.P. (1972) Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) under the influence of sodium chloride. *Indian J. Agric. Sci.* **42**: 384-386.



- Suzuki, A.; Gadal, P. y Oaks, A. (1981) Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta*. **151**: 457-461.
- Suzuki, A.; Vidal, J. y Gadal, P. (1982) Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf and root tissues. *Plant Physiol.* **70**: 827-832.
- Suzuki, A.; Vidal, J.; Nguyen, J. y Gadal, P. (1984) Occurrence of ferredoxin-dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodules (*Glycine max*). *FEBS Lett.* **19**: 204-208.
- Suzuki, A.; Audet, C. y Oaks, A. (1987) Influence of light on the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves. *Plant Physiol.* **84**: 578-581.
- Taubert, P. (1894) Leguminosae. En: Engler, A., y Prantl, K. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Part. 3, sec. 3. Leipzig: Engelmann, 396 pp.
- Tewari, T.N. y Singh, B.B. (1991) Stress studies in lentil (*Lens esculenta* Moench). *Plant Soil*, **136**: 225-230.
- Thomas, H. (1978) Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta* **142**: 161-169.
- Thorneley, R.N.F. (1990) Kinetics and mechanisms of ATP hydrolysis, electron transfers and proton release by *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. 8th International Congress on Nitrogen Fixation, L-07. Knoxville, Tennessee.
- Thummler, F. y Verma, D.P.S. (1987) Nodulin 100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free haem in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**: 14730.
- Tingey, S.V.; Walker, E.L. y Coruzzi, G.M. (1987) Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* **6**: 1-9.
- Tirado, J.L.; Conejero, G. y Robin, P. (1990a) Comparaison des activités glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase dans la feuille de *Glycine max*. Distribution dans la plante et effet de l'ammonium et du nitrate. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 239-250.
- Tirado, J.L.; Conejero, G. y Robin, P. (1990b) Comparaison des activités glutamine synthétase, glutamate déshydrogénase et nitrate réductase chez *Glycine max*. Effet de l'obscurité sur le première feuille trifoliée. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 251-257.
- Tjepkema, J.D. y Yocum, C.S. (1974) Measurement of nitrogen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. *Planta* **119**: 351-360.
- Tobin, A.K., Ridley, S.M. y Stewart G.R. (1985) Changes in the activities of chloroplast and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. *Planta* **163**: 544-548.
- Treeby, M.T. y van Steveninck, R.F.M. (1988a) The influence of salinity on phosphate uptake and distribution in lupin roots. *Physiol. Plant.* **72**: 617-622.
- Treeby, M.T. y van Steveninck, R.F.M. (1988b) Effects of salinity and phosphate on ion distribution in lupin leaf. *Physiol. Plant.* **73**: 317-322.

- Truchet, G.; DeBelle, F.; Vasse, J.; Terzaghi, B.; Garnerone, A.; Rosenberg, C.; Batut, J.; Maillet, F. y Denarie, J. (1985) Identification of *Rhizobium meliloti* pSym2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.* **164**: 1200.
- Venekamp, J.H. y Koot, J.T.M (1988) The sources of free proline and asparagine in field bean plants, *Vicia faba* L., during and after a short period of water withholding. *J. Plant Physiol* **132**: 102-109.
- Vicent, J.M. (1977) *Rhizobium*: General Microbiology. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section III. R.W.F. Hardy y W.S. Silver (eds.), pp. 277-366. J. Wiley and Sons, New York.
- Vicent, J.M. (1980). En: A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. Internacional Biological Programme Handbook 15. Blackwell, Oxford.
- Walker, E.L. y Coruzzi, G.M. (1989) Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **91**: 702-708.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J. y Miflin, B.J. (1979) Distribution of enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.* **63**: 232-236.
- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J.; Keys, A.J. y Miflin, B.J (1983) Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. *Plant Cell Environ.* **6**: 301-309.
- Ward, M.R.; Trischner, R. Huffaker, R.C. (1988) Inhibition of nitrate transport by antinitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. *Plant Physiol.* **88**: 1141-1145.
- Ward, M.R.; Grimes, H.D. y Huffaker, R.C. (1989) Latent nitrate reductase activity is associated with the plasma membrane of corn root. *Planta* **177**: 470-475.
- Weber, M.; Schmidt, S.; Schuster, C. y Mohr, H. (1990) Factor involved in the coordinate appearance of nitrite reductase and glutamine synthetase in the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling. *Planta* **180**: 429-434.
- Wilson, J.R. (1970) Response to salinity in *Glycine*. VI. Some effect of a range of short-term salt stresses on growth, nodulation and nitrogen fixation of *Glycine wightii*. *Austr. J. Agric. Res.* **21**: 571-582.
- Wolk, C.P.; Thomas, J.; Shaffer, P.W.; Austin, S.M. y Galonsky, A. (1976) Pathway of nitrogen metabolism after fixation of <sup>13</sup>N-labelled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* **251**: 5027-5034.
- World Resources (1987) An assessment of the resource base and the supports for the global economy. International Institute for Environment and Development, World Resources Institute. Basic Books, New York.
- Yamaya, T.; Oaks, A. y Matsumoto, H. (1984) Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol.* **76**: 1009-1013.
- Yelton, M.M. y Yoch, D.C. (1981) Nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*: characterization of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 335-342.

- Yelton, M.M., Yang, S.S., Edie, S.A. y Lim, S.T. (1983) Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1537-1547.
- Yousef, A.N. y Sprent, J.I. (1983) Effect of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  fertilized *Vicia faba* L. plants. *J. Exp. Bot.* **143**: 941-950.
- Zahran, H.H. y Sprent, J.I. (1986) Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *R. leguminosarum*. *Planta*, **167**: 303-309.